

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor : Professor Dr. med. H. Hamelmann

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
OPTIMIERUNG UND STANDARDISIERUNG
DER BESTIMMUNG VON PYRUVAT IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität
Marburg

vorgelegt von

JÜRGEN ACHENBACH
aus Breidenstein

1977

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor : Professor Dr. med. H. Hamelmann

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
OPTIMIERUNG UND STANDARDISIERUNG
DER BESTIMMUNG VON PYRUVAT IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität
Marburg

vorgelegt von

JÜRGEN ACHENBACH
aus Breidenstein

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 11. März 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan : Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent : Prof. Dr. med. H. Hamelmann
Correferent : Prof. Dr. med. dent. H. Bernhardt

Inhaltsübersicht

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Pyruvat und Intermediärstoffwechsel	1
1.1.1. Pyruvat und der Kohlenhydrat-Stoffwechsel	1
1.1.1.1. aerober Kohlenhydratabbau (Citronensäurecyclus)	2
1.1.1.2. anaerober Kohlenhydratabbau (Lactatbildung)	3
1.1.1.3. Pyruvatcarboxylierung (Oxalacetatbildung)	4
1.1.1.4. Pyruvat und alkoholische Gärung	5
1.1.2. Pyruvat und der Aminosäure-Stoffwechsel	5
1.1.3. Pyruvat und der Fettstoffwechsel	7
1.2. Bedeutung des Pyruvates für die klinische Diagnostik und die experimentelle Medizin	8
1.3. Pyruvat-Normalwerte nach Literaturangaben	12
2. PROBLEMATIK	16
3. METHODIK	22
3.1. Bemerkungen zur photometrischen Bestimmungs- methodik	22
3.2. Berechnung der Pyruvatkonzentration	24
3.3. Blutentnahme	25
3.4. Vorversuche	26
3.5. Aufarbeitungsschema der Blutproben	29
3.5.1. für die Mikromethode BOEHRINGER	29
3.5.2. für die mod. Bestimmungsmethodik CZOK-LAMPRECHT	31
3.6. Mikromethode BOEHRINGER	33
3.6.1. Ermittlung des Berechnungsfaktors	37

	Seite
3.7. Modifizierte Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT	37
3.7.1. Ermittlung des Berechnungsfaktors	41
3.7.2. Umrechnung der Zentrifugal-Beschleunigung in U/min	42
3.8. Simultan-Doppelbestimmungen	43
3.9. Recovery-Tests	46
3.9.1. Berechnung der Pyruvatkonzentrationen	47
3.9.1.1. Mikromethode BOEHRINGER	48
3.9.1.2. mod. Methode CZOK-LAMPRECHT	49
3.10. Fehlerbreiten der Methoden	51
3.10.1. Mikromethode BOEHRINGER	51
3.10.2. mod. Methode CZOK-LAMPRECHT	53
3.10.3. Erläuterung der Kontrollergebnisse	55
3.11. Verwendete Geräte	59
3.12. Statistische Berechnungen	60
4. ERGEBNISSE	62
4.1. Mikromethode BOEHRINGER	62
4.1.1. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut	62
4.1.2. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand	65
4.1.3. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand	66
4.2. Modifizierte Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT	68
4.2.1. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut	68
4.2.2. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand	71
4.2.3. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand	73
4.3. Vergleich der Ergebnisse aus beiden Bestimmungs- methoden	75

	Seite
4.4. Simultan-Doppelbestimmungen	78
4.5. Recovery-Tests	83
5. DISKUSSION	85
5.1. Unterschiedliche Verfahren zur Pyruvatbestimmung	85
5.2. Pyruvat-Normalwerte durch eigene Untersuchungen	88
5.3. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut	89
5.4. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand	93
5.5. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand	96
5.6. Folgerungen aus den Ergebnissen der Pyruvatkonzentrationen im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand	99
5.7. Vergleich der Ergebnisse aus beiden Bestimmungsmethoden	101
5.8. Simultan-Doppelbestimmungen	103
5.9. Recovery-Tests	104
5.10. Folgerungen aus dem Vergleich der beiden angewandten optisch-enzymatischen Pyruvat-Bestimmungsmethoden	105
6. ZUSAMMENFASSUNG	108
7. ABBILDUNGEN	111
8. TABELLEN	119
9. LITERATURVERZEICHNIS	138



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0006

1. EINLEITUNG

1.1. Pyruvat und Intermediärstoffwechsel

Unter dem Begriff Intermediärstoffwechsel faßt man alle chemischen Umbauprozesse in einem Organismus zusammen. Die beteiligten chemischen Verbindungen heißen Metabolite. Diese werden definiert als eine Komponente der normalen Sequenz der Stoffwechselreaktionen (35).

Die Aufgabe des Intermediärstoffwechsels ist einerseits die Bereitstellung der Zwischenprodukte für den Aufbau der spezifischen körpereigenen Substanzen, gleichzeitig liefert er für spezielle Leistungen des Organismus (z. B. Muskelarbeit) die chemische Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat).

Das Pyruvat besitzt im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Stellung (42, 49, 75); es tritt als Metabolit im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel auf und verbindet diese Stoffwechselwege miteinander. Ferner besteht über das Pyruvat eine Verbindung zum Citronensäurecyclus (42, 75).

1.1.1. Pyruvat und der Kohlenhydrat-Stoffwechsel

Pyruvat, das Salz der Brenztraubensäure, ist im anaeroben wie aeroben Kohlenhydrat-Stoffwechsel der wichtigste Metabolit (42).

Seine zentrale Stellung ist aus der Abb. 1 ersichtlich :

Abb. 1 : nach KARLSON

Glykogen geht durch Phosphorolyse ohne ATP-Verbrauch in Glucose-1-phosphat und durch anschließende Phosphatverschiebung in Glucose-6-phosphat über.

Glucose wird durch das Enzym Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Dabei ist ATP der Phosphatdonator (Verbrauch von 1 Mol ATP).

Glucose-6-phosphat wird durch die Phosphohexoseisomerase zu Fructose-6-phosphat isomerisiert.

Diese wird durch die Phosphofructokinase unter ATP-Verbrauch zu Fructose-1,6-diphosphat phosphoryliert.

Die folgende hydrolytische Spaltung in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat (Triosephosphate) wird durch die Aldolase katalysiert.

Es folgt die Dehydrierung des Glycerinaldehydphosphates zu 3-Phosphoglycerinsäure :

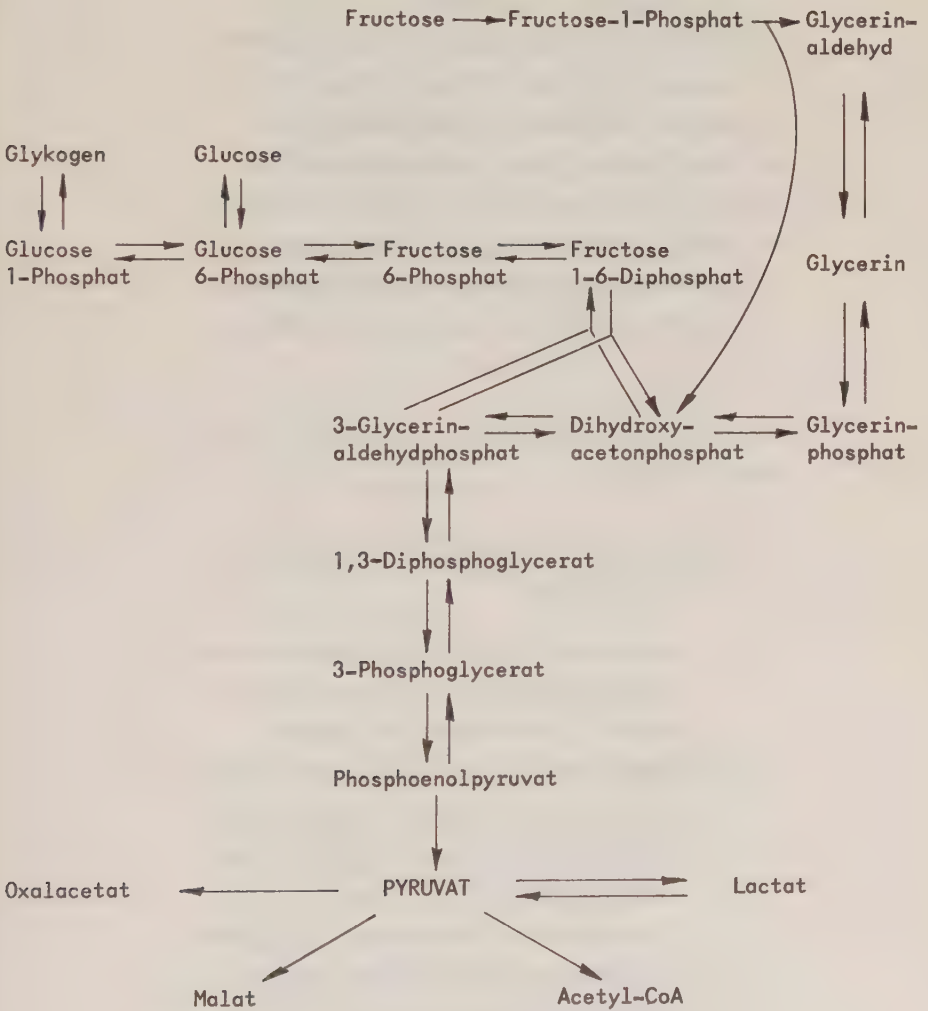
Die Aldehydgruppe wird an eine SH-Gruppe des Enzyms Phosphotriosedehydrogenase addiert. Bei der sich anschließenden Dehydrierung wird der Wasserstoff auf NAD^+ übertragen. Es entsteht ein Thioester, der zu 1,3-Diphosphoglycerinsäure phosphoryliert wird.

Ein Phosphatrest wird durch die Phosphoglyceratkinase auf ADP übertragen. Es entstehen 3-Phosphoglycerinsäure und 1 Mol ATP. Diese ATP-Bildung wird als Substrat-Kettenphosphorylierung bezeichnet.

3-Phosphoglycerinsäure wird durch die Phosphoglyceromutase in die 2-Phosphoglycerinsäure umgelagert. Es folgt die Wasserabspaltung durch die Enolase. Es entsteht Phosphoenol-pyruvat, die phosphorylierte Enolform des Pyruvates.

Die Phosphorsäure wird durch die Phosphopyruvatkinase auf ADP übertragen - Bildung eines Mols ATP - , und es entsteht als wichtigster Metabolit im Kohlenhydrat-Stoffwechsel das Pyruvat (42).

Abb. 1 : Wichtige Zwischenprodukte im Kohlenhydratstoffwechsel
(EMBDEN-MEYERHOF-Schema)



Der Kohlenhydratabbau nimmt seinen Ausgang vom Glykogen, der Glucose und der Fructose, die auf einem weitgehend gleichen Weg über mehrere Zwischenstufen zu Pyruvat abgebaut werden (EMBDEN-MEYERHOF-Schema).

Die Dehydrierung des Glycerinaldehydphosphates ist vom energetischen Standpunkt der wichtigste Schritt im EMBDEN-MEYERHOF-Abbau (42), da diese Reaktion stark exergonisch ist (freie Enthalpie oder freie Energie : $\Delta G^0 = 16 \text{ kcal}$). Von dieser Energie werden 7 kcal als chemische Energie durch Bildung eines Mols ATP bereitgestellt. Die restliche Energie wird als Wärme frei.

Pyruvat kann in verschiedener Weise weiter umgesetzt werden :

1.1.1.1. aerober Kohlenhydratabbau (Citronensäurecyclus) :

Unter aeroben Verhältnissen wird Pyruvat durch oxydative Decarboxylierung weiter zu aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) abgebaut. Über aktivierte Essigsäure besteht eine Verbindung zum Citronensäurecyclus, der "Drehscheibe des Stoffwechsels" (42).

Die oxydative Decarboxylierung ist der quantitativ wichtigste Abbauweg des Pyruvates (42).

Die Energiebilanz des aeroben Kohlenhydratabbaues ist folgende (der Prägnanz wegen wurde die folgende Darstellung bis zum Punkt 1.1.3. zum Teil aus dem Lehrbuch "KARLSON, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler" entlehnt (42) :

Bis zur Bildung des Pyruvates entstehen aus Triose 1 Mol ATP und 1 Mol $\text{NAD}\cdot\text{H}+\text{H}^+$, also aus 1 Mol Glucose 2 Mol ATP und 2 Mol $\text{NAD}\cdot\text{H}+\text{H}^+$. Bei der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvates zu Acetyl-CoA wird wiederum NAD^+ reduziert. Die Oxydation über die Atmungskette liefert 3 Mol ATP pro 1 Mol $\text{NAD}\cdot\text{H}+\text{H}^+$, insgesamt also 6 Mol ATP. Bis zur Bildung des Acetyl-CoA werden damit 7 Mol ATP pro 1 Mol Triose gewonnen.

Die vollständige Oxydation von aktivierter Essigsäure liefert nochmals 12 Mol ATP pro Triose.

Der aerobe Abbau eines Mols Glucose liefert also insgesamt 38 Mol ATP.

1.1.1.2. anaerober Kohlenhydratabbau (Lactatbildung):

Besteht am Ort des Kohlenhydratabbaues ein Sauerstoffmangel, muß der Energieverbrauch durch anaerobe Glykolyse gedeckt werden.

Pyruvat wird dabei unter Einwirkung der Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert unter gleichzeitiger Oxydation von $\text{NAD}\cdot\text{H}+\text{H}^+$ zu NAD^+ .

Die Energiebilanz der anaeroben Glykolyse beträgt im Gegensatz zur aeroben Glykolyse lediglich 2 Mol ATP pro 1 Mol Glucose. Das bedeutet, daß 1 Mol Glucose unter Bildung von 2 Mol ATP zu 2 Mol Lactat abgebaut wird.

Lactat ist jedoch ein relativ energiereiches Substrat, das bei genügender Sauerstoffzufuhr in der Leber zu Glucose resynthetisiert wird. Um diese Gluconeogenese zu ermöglichen, müssen 20 bis 30 % des Lactates zur Bereitstellung der benötigten Energie völlig verbrannt werden. Damit handelt es sich um eine unökonomische Substratverwertung.

1.1.1.3. Pyruvatcarboxylierung (Oxalacetatbildung) :

Ein weiterer Stoffwechselweg, der vom Pyruvat seinen Ausgang nimmt, ist die WOOD-WERKMAN-Reaktion, in der die Brenztraubensäure zu Oxalacetat carboxyliert wird.

Hierbei werden zwei Reaktionswege unterschieden :

- a) Der wichtigste Weg besteht in einer Anlagerung von aktivierter Kohlensäure durch ein Biotinenzym unter Einwirkung der Pyruvatcarboxylase. Dies ist eine ATP verbrauchende Reaktion.
- b) Der zweite Weg ist die reduzierende Carboxylierung ($\text{OCHOA} : + \text{CO}_2 + \text{NADP} \cdot \text{H} + \text{H}^+$), die vom Malatenzym katalysiert wird.

Die Bildung von Oxalacetat gilt als "Initialzündung" (42) des Citronensäurecyclus. Dabei benötigt Oxalacetat als Kondensationspartner Acetyl-CoA. Ferner ist sie bedeutungsvoll als eine Startreaktion der Gluconeogenese.

1.1.1.4. Pyruvat und alkoholische Gärung

Bei niederen Organismen erfolgt der Abbau des bei der Glycolyse anfallenden Pyruvates in der alkoholischen Gärung.

Dabei wird Pyruvat durch die Pyruvat-Decarboxylase, einem Enzym, das nur im Pflanzenreich vorkommt, zu Acetaldehyd abgebaut.

Acetaldehyd wird durch die Alkohol-Dehydrogenase zu Äthylalkohol reduziert. Alkohol ist ein energiereiches Substrat.

1.1.2. Pyruvat und der Aminosäure-Stoffwechsel

Pyruvat tritt weiterhin als Metabolit im Stoffwechsel der Aminosäuren Alanin, Cystein, Serin, Glycin (Glykokoll), Threonin und Glutaminsäure auf.

Alanin kann durch Transaminierung zu Pyruvat abgebaut werden. Die Bedeutung der Transaminierung liegt zum größten Teil darin, daß der Stickstoff des Alanins von der Glutaminsäure in den Harnstoff überführt wird. Durch oxydative Decarboxylierung des Pyruvates erfolgt

Umgekehrt kann aus Pyruvat mit den Cofaktoren Glutaminsäure, Pyridoxaminphosphat und Pyridoxalphosphat der Aufbau von Alanin erfolgen.

Cystein wird hauptsächlich durch zwei Reaktionsfolgen abgebaut. Eine davon ist der Abbau durch eine Desulphydrase zu Pyruvat, H_2S und NH_3 .

Serin kann durch Wasserabspaltung zur ungesättigten Aminosäure und weiter über die Iminosäure zu Pyruvat abgebaut werden.

Durch Mitwirkung der Coenzyme Tetrahydrofolsäure und Pyridoxalphosphat kann Glycin in Serin übergehen.

Die essentielle Aminosäure Threonin kann durch eine Threoninaldolase in Acetaldehyd und Glycin gespalten werden. Über das Serin besteht dann wieder eine Verbindung zum Pyruvat.

Bei der Gluconeogenese in der Leber werden die glucoplastischen Aminosäuren Alanin, Cystein, Serin, Glycin und Threonin zuerst in Pyruvat umgewandelt, womit die Verbindung zum Kohlenhydrat-Stoffwechsel hergestellt ist. Vom Pyruvat aus erfolgt die Gluconeogenese über die WOOD-WERKMAN-Reaktion zu Oxalacetat. Die weiteren Reaktionen stellen im wesentlichen eine Umkehrung der Glykolyse dar, wobei die Energieschranken, die eine einfache Umkehrung unmöglich machen, umgangen werden.

1.1.3. Pyruvat und der Fettstoffwechsel

Pyruvat und der Fettstoffwechsel stehen über die aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA) miteinander in Verbindung.

Acetyl-CoA, das im aeroben Kohlenhydratabbau durch die oxydative Decarboxylierung des Pyruvates entsteht, ist das Ausgangssubstrat für den Fettsäureaufbau.

Acetyl-CoA wird unter Mitwirkung von ATP und Carboxybiotin zu Malonyl-CoA carboxyliert.

Die eigentlichen Synthesereaktionen vollziehen sich an einem Kondensationsenzym bzw. an einem Multi-Enzym-Komplex.

Als Startreaktion kann der Transfer eines Acetylrestes vom Acetyl-CoA auf eine HS-Gruppe einer Cystein-Seitenkette des Kondensationsenzyms angesehen werden.

Das Malonyl-CoA wird auf eine weitere zentrale reaktive HS-Gruppe des Enzym-Komplexes übertragen. Es folgt die Kondensation der Acetylgruppe mit der H_2C -Gruppe des Malonylrestes zum β -Ketosäurederivat, wobei die C-Kette um eine C_2 -Einheit verlängert und CO_2 abgespalten wird.

Das β -Ketosäurederivat wird durch $NADP \cdot H + H^+$ reduziert.

Es folgen Wasserabspaltung und eine weitere Reduktion durch $NADP \cdot H + H^+$.

Der verlängerte Acetylrest wird schließlich auf die erste HS-Gruppe rückübertragen, wodurch die zentrale HS-Gruppe wieder frei wird und erneut einen Malonylrest aufnehmen kann. So kann die

1.2. Bedeutung des Pyruvates für die klinische Diagnostik und die experimentelle Medizin

Die Bestimmung von Pyruvat im Blut und Gewebe hat Bedeutung für die klinische Diagnostik und die experimentelle Medizin (11, 26, 35, 43, 51, 66, 67).

In der klinischen Beurteilung des Gas- und Energiestoffwechsels im Organismus ist es von Bedeutung, neben den Atemgaspartialdrücken und Größen des Säure-Basen-Haushaltes auch die aktuellen Glucose-, Lactat- und Pyruvatkonzentrationen im Blut zu kennen (77).

Unter zellulärer Hypoxie (Schockzuständen) kommt es entsprechend dem EMBDEN-MEYERHOF-Schema zu einem Anstieg der Milchsäure. Diese Anhäufung des Lactates kann zu einer lebensbedrohlichen Lactatacidose führen (41, 64, 81).

Das Redoxsystem Lactat/Pyruvat soll demnach ein empfindlicher Indikator für die Sauerstoffsättigung bzw. Sauerstoffschuld der Gewebe sein, und die Bestimmung der Substrate Lactat und Pyruvat erlangt somit differentialdiagnostische Bedeutung für die prognostische Einschätzung von Schockzuständen und Formen des cardiorespiratorischen Versagens (9, 51).

HUCKABEE (37 - 41) prägte 1957 den Begriff des "Excess-lactates (XL)". Er versteht darunter eine Stoffwechselgröße, die eine Aussage über den Redoxstatus einzelner Organe machen soll. Aus dem Lactat- und Pyruvatgehalt des Blutes wird dieser Wert nach folgender Formel errechnet :

$$XL = (L_t - L_o) - (P_t - P_o) \cdot \frac{L_o}{P_o}$$

Es bedeuten : L_t = Lactat zur Zeit t , L_0 = Lactat-Normalwert während der Ausgangslage, P_t = Pyruvat zur Zeit t , P_0 = Pyruvat-Normalwert während der Ausgangslage.

Aufgrund des Exceßlactatwertes kann die Überlebenschance eines Patienten im Schockzustand abgeschätzt werden.

WEIL und AFIFI (79) haben untersucht, ob Exceßlactat, Lactat/Pyruvat oder Lactat allein bessere Indikatoren für die Charakterisierung des Schockzustandes sind. Nach Meinung dieser Autoren ist die Messung des Exceßlactates kompliziert und ungenau, da die Pyruvat- und Lactatwerte des Patienten vor dem Schockzustand unbekannt sind.

Sie sind zu der Auffassung gelangt, daß die kumulative Sauerstoffschuld in Beziehung zur Überlebensdauer steht.

Die alleinige Messung von Lactat ist der kumulativen Sauerstoffschuld am engsten korreliert. Des weiteren zeigten sie, daß Exceßlactat und der Lactat/Pyruvat-Quotient keine zusätzlichen Informationen hinsichtlich der Voraussagbarkeit der Sauerstoffschuld erbringen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt VON WICHERT (81). Er stimmt mit WEIL und AFIFI darin überein, daß die Bestimmung des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Blut für klinische Untersuchungen sinnlos ist, da keine Normalwerte zu erhalten sind. Auch die Bestimmung der Parameter Lactat, Pyruvat und Exceßlactat sind nach VON WICHERT für die quantitative oder qualitative Einschätzung eines Schockzustandes ohne Bedeutung.

Er ist zu der Auffassung gelangt, daß Kreislaufparameter zur Erfassung des Schockgeschehens geeigneter sind (1, 59).

Bei der LITTLE'schen Erkrankung hat BAUER (3) erhöhte Pyruvatkonzentrationen im Blut feststellen können. Gegenüber den gemessenen Normalwerten von 0,53 mg Pyruvat pro 100 ml Blut fand er in Fällen hochgradiger Spastik Pyruvatkonzentrationen bis zu 1,6 mg/100 ml. Diese erhöhten Werte führt BAUER auf die erhöhte Muskelarbeit bei diesem Krankheitsbild zurück. Es besteht eine deutliche Abhängigkeit der Pyruvatkonzentration vom Ausmaß der Spastik.

REDETZKI, BLOEDORN und BANSI fanden bei Patienten mit Erkrankungen an Hepatitis und Lebercirrhose eine signifikante Erhöhung der Pyruvat- und α -Ketoglutar-säure-Nüchternblutwerte, die vom Ausmaß der Parenchymzerstörung beeinflußt wurden (62).

Durch Untersuchung von je 17 Patienten wurde bei Leberkranken unter Grundumsatzbedingungen eine venöse Pyruvatkonzentration von $0,964 \pm 0,392$ mg/100 ml gegenüber $0,573 \pm 0,163$ mg/100 ml bei Gesunden gemessen.

Diese erhöhten Werte führen die Autoren auf eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels zurück. Es fanden sich Veränderungen in der Verwertung von Hexosen und Hypoglykämien.

Andere Autoren, wie z. B. VON EULER (21), KIPPING (43) und TSIRIMBAS (75) berichten in klinischen und tierexperimentellen Arbeiten über Zusammenhänge zwischen Pyruvatkonzentrationen und Geschwulsterkrankungen, wie z. B. Sarkomen und Carzinomen.

Als Ergebnisse dieser Untersuchungen fanden die Autoren, daß sowohl im Serum als auch im Blut von Gesunden und Tumorkranken ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Pyruvatkonzentration besteht.

TSIRIMBAS und STICH (75) fanden im Serum von Gesunden einen Mittelwert von 0,64 mg/100 ml gegenüber 0,98 mg/100 ml bei Kranken ($p < 0,001$).

Im Vollblut betrug die Pyruvatkonzentration bei Gesunden im Mittelwert 0,56 mg/100 ml bzw. 0,85 mg/100 ml bei Kranken ($p < 0,01$).

Diese erhöhte Pyruvatkonzentration ist aber nicht spezifisch für die jeweilige Geschwulstkrankheit.

Erhöhte Pyruvatkonzentrationen wurden - außer bei Leber- und Geschwulstkrankheiten - gefunden bei Diabetes mellitus, Fettsucht, Hyperthyreose, Nierenerkrankheiten, Infektionskrankheiten, Arthrosen und Pellagra (75).

In der experimentellen Medizin dient der Lactat/Pyruvat-Quotient unter anderem bei der isolierten Leberperfusion als Indikator für die Funktionstüchtigkeit der Leber (35, 65, 66, 67).

Bei dieser Methode wird die Leber an ein künstliches System (Herz-Lungen-Maschine) angeschlossen und von einem Perfusionsmedium durchströmt. Als Perfusionsmedium werden arteigenes Vollblut, halbsynthetische Medien oder erythrocytenfreie Salzlösungen mit und ohne onkotisch wirksamen Substanzen verwendet.

Eine Schädigung des Organes durch andauernde Hypoxie zeigt sich in einer Verschiebung des Lactat/Pyruvat-Quotienten, da Pyruvat infolge des Sauerstoffmangels zu Lactat reduziert wird.

Im Perfusionsmedium einer funktionstüchtigen, extrakorporal perfundierten Rattenleber fand SCHIMASSEK einen Lactat/Pyruvat-Quotienten von 10, der unter Sauerstoffsättigung auch bei einem Mehrangebot von Lactat (Lactatdauerinfusion) autoregativ beibehalten wurde.

Da dieser Wert bei Lactatdauerinfusion konstant bleibt, kann gesagt werden, daß er vom absoluten Substratgehalt unabhängig ist (67).

HOHORST, THORN et. al. fanden bei Untersuchungen über Metabolitkonzentrationen im Rattenlebergewebe einen optimalen Lactat/Pyruvat-Quotienten von 20 (35, 72).

1.3. Pyruvat-Normalwerte nach Literaturangaben

BUEDING und WORTIS (11) fanden bei gesunden Versuchspersonen, nüchtern und während Bettruhe, venöse Pyruvatkonzentrationen von 0,77 mg/100 ml bis 1,16 mg/100 ml. Es ergab sich ein Mittelwert von 0,98 mg/100 ml bei einer Standardabweichung S.D. = $\pm$ 0,09 mg/100 ml. Die Messungen erfolgten mit der von ihnen modifizierten 2-4-Dinitrophenylhydrazin-Methode.

LU (50) fand dagegen mit der von ihm modifizierten 2-4-Dinitrophenylhydrazin-Methode eine mittlere venöse Pyruvatkonzentration von 0,770 mg/100 ml.

PLATT und LU (61) konnten mit der von ihnen modifizierten Methode bei sechzig nüchternen Versuchspersonen eine venöse Pyruvatkonzentration zwischen 0,4 mg/100 ml und 0,75 mg/100 ml messen.

FRIEDEMANN und Mitarbeiter (24) stellten bei nüchternen Versuchspersonen nach einer fünfzehn bis zwanzig minutigen Bettruhe mit der von ihnen modifizierten 2-4-Dinitrophenylhydrazin-Methode eine venöse Pyruvatkonzentration zwischen 0,59 mg/100 ml und 0,94 mg/100 ml fest.

HUCKABEE (38) konnte bei fünfzehn Messungen mit der von FRIEDEMANN und HAUGEN modifizierten Methode eine mittlere Pyruvatkonzentration von 0,119 m M/L messen.

Die ebenfalls von ihm gemessenen arteriellen Konzentrationen waren größer. Sie betrugen 0,142 m M/L.

Autoren, die Pyruvatkonzentrationen mit enzymatischen Nachweismethoden gemessen haben, geben niedrigere Werte an.

GLOSTER und HARRIS (26) konnten bei Untersuchungen der arteriellen Pyruvatkonzentration einen mittleren Wert von 0,0553 mM entsprechend 0,49 mg/100 ml messen.

LANDON (47) fand bei dreißig nüchternen Personen venöse Pyruvatwerte zwischen 0,36 mg/100 ml und 0,59 mg/100 ml. Es ergab sich ein Mittelwert von 0,44 mg/100 ml (S.D. = $\pm$ 0,05).

Bezüglich der Pyruvatkonzentrationen konnte er zwischen den Geschlechtern keinen Unterschied feststellen. Die gemessenen Konzentrationen waren unabhängig vom Alter der Versuchspersonen.

Die von BAUER (3) festgestellten Werte lagen dagegen höher. Bei zweiundvierzig Personen, denen Blut aus der ungestauten Vene entnommen wurde, fand er Werte von 0,30 mg/100 ml bis 0,81 mg/100 ml.

Als Mittelwert ergab sich eine Pyruvatkonzentration von 0,53 mg/100 ml.

Vergleichbare Werte konnte REDETZKI (62) messen, der das Blut unter Grundumsatzbedingungen der ungestauten Vene entnahm. Er fand eine Pyruvatkonzentration von 0,573 mg/100 ml $\pm$ 0,163.

Eine noch höhere Pyruvatkonzentration fand SEGAL (68). Durch Untersuchungen der venösen Blutproben von vierzehn gesunden Versuchspersonen, nüchtern und bei Bettruhe, ergaben sich Konzentrationen zwischen 0,39 mg/100 ml und 0,86 mg/100 ml bei einem Mittelwert von 0,66 mg/100 ml.

Ferner weist SEGAL auf die große Variabilität und physiologische Streubreite der Pyruvatkonzentration im täglichen und wöchentlichen Verlauf hin.

Bei einer Versuchsperson bewegten sich die morgendlichen Nüchternwerte innerhalb einer Woche zwischen 0,49 mg/100 ml und 0,86 mg/100 ml.

Nach BAUER (3) kann bereits eine mangelnde körperliche und seelische Entspannung, bedingt durch die bevorstehende Blutentnahme, eine Änderung der Pyruvatkonzentration hervorrufen. Er erinnert an Untersuchungen von GITELSON und TIBERIN, die bei dreizehn von sieben Patienten am Morgen vor einer Operation höhere Pyruvatwerte fanden als an anderen Tagen.

TSIRIMBAS (75) fand bei seinen Untersuchungen im Vollblut eine mittlere Pyruvatkonzentration, die der von BAUER und REDETZKI gemessenen entspricht. Er untersuchte die Blutproben von einundzwanzig nüchternen Versuchspersonen in völliger Bettruhe. Die Blutentnahme erfolgte aus einer ungestauten Vene.

Dabei ergaben sich Werte zwischen 0,35 mg/100 ml und 0,79 mg/100 ml. Bei einer Standardabweichung von S.D. = $\pm 0,11$ betrug der Mittelwert 0,56 mg/100 ml.

Auch die von MARBACH (51) gemessenen venösen Pyruvat-Nüchternblutwerte liegen in diesem Bereich. Bei zehn Versuchspersonen fand er eine mittlere Pyruvatkonzentration von 0,061 m M/L entsprechend 0,54 mg/100 ml.

TFELT-HANSEN (74) untersuchte Pyruvatkonzentrationen von dreißig Neugeborenen. Die gemessenen Werte schwanken zwischen 0,024 m M/L und 0,13 m M/L bei einem Mittelwert von 0,056 m M/L entsprechend 0,49 mg/100 ml.

ULMER und RASCHE (76) fanden bei Untersuchungen von vierzig Personen eine mittlere venöse Pyruvatkonzentration von 0,121 m M/L (1,066 mg/100 ml). Diese Konzentration ist damit mit den Werten vergleichbar, die durch Messungen mit chemischen Methoden zu erhalten sind.

2. PROBLEMATIK

Eine Pyruvatbestimmung mit guter Präzision (Standardabweichung als Meßgröße für die zufälligen Fehler) und Richtigkeit (Abweichung vom Sollwert; Meßgröße für die systematischen Fehler) stößt auf Schwierigkeiten (13).

Die Problematik liegt im Verhalten der chemischen Substanz Pyruvat im dynamischen Gleichgewicht des Stoffwechsels.

Dabei muß zwischen dem Verhalten des Pyruvates in zellhaltigen Lösungen (Vollblut) und wässrigen Lösungen unterschieden werden.

Im stehenden Vollblut verändern nach Blutentnahme Erythrocytenstoffwechsel und Plasmaenzymaktivität die momentane Pyruvatkonzentration (62, 82). Dabei kommt es zu einer Umwandlung von Pyruvat zu Lactat und somit zu einer Verschiebung zur reduzierten Seite. Die gemessenen Pyruvatkonzentrationen entsprechen nun nicht mehr der Stoffwechselsituation des Organismus, dem die Blutproben entnommen wurden. Die Interpretation dieser Ergebnisse führt dann zu falschen Schlüssen.

In wässrigen Lösungen entfallen die aktiven Stoffwechselfaktoren des Vollblutes. Wie jedoch Untersuchungen von CZOK, HOHORST, LAMPRECHT, PANNIER und STRUCK ergeben haben, kommt es aber auch in wässrigen Lösungen zu Veränderungen der Pyruvatkonzentration (18, 35, 60, 71). Als Ursache werden Polymerisation (71, 80) und Umwandlung in Lactat diskutiert (26).

Sinn einer präzisen und richtigen Pyruvatbestimmung ist es aber, aus einem dynamischen biochemischen Gleichgewicht eine Momentaufnahme der Pyruvatkonzentration zu erhalten.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Momentaufnahme kann dann ein Rückschluß auf die Redoxsituation eines Organismus bzw. Organes erfolgen.

HOHORST spricht in diesem Zusammenhang von einem "Status in vivo", d. h. von der Größe, die durch unsere Messungen bestimmt werden soll. Als "alterierten Status" bezeichnet HOHORST die Größe, die durch die Messungen tatsächlich erfaßt wird. Die wesentliche Aufgabe einer methodischen Arbeit liegt darin, die Differenz zwischen beiden Größen so klein wie möglich zu halten und sie zu bestimmen (35).

Um eine Pyruvatbestimmung im Sinne der Momentaufnahme bzw. des "Status in vivo" durchführen zu können, werden von den einzelnen Autoren unterschiedliche Verfahren angegeben. Dabei spielen Art der Enteiweißung, pH-Wert, Puffersysteme, Temperatur und die Zeit eine entscheidende Rolle.

Einige Autoren, wie z. B. HENLEY, LANDON, SEGAL und VON WICHERT enteiweißen das entnommene Blut mit Perchlorsäure (29, 47, 68, 82). VON WICHERT weist besonders darauf hin, daß das Blut nach Entnahme sofort enteiweißt werden muß, damit Erythrocytenstoffwechsel und Plasmaenzymaktivität die Pyruvatkonzentration nicht verändern (82). HUCKABEE konnte feststellen, daß es im einminutigen Intervall zwischen Blutentnahme und Enteiweißung zu einem Pyruvatverlust von 3 % kommt (37).

BAUER, FRIEDEMANN, GLOSTER, HARRIS, HAUGEN et. al. empfehlen die Enteiweißung des Blutes mit Trichloressigsäure (3,

23, 26). Bei Enteiweißung mit Perchlorsäure konnten GLOSTER und HARRIS eine definierte Pyruvatmenge nur zu 76 % wiederfinden, bei Enteiweißung mit Trichloressigsäure dagegen zu 97 %. Sie sind daher zu der Auffassung gelangt, daß die LDH-Aktivität durch Perchlorsäure nicht vollständig inaktiviert wird. Nach Meinung dieser Autoren kann dagegen durch eine Enteiweißung mit Trichloressigsäure eine weitaus bessere Inaktivierung der LDH erreicht werden (26).

MARBACH und WEIL empfehlen die Enteiweißung mit Metaphosphorsäure, da NADH in Gegenwart von Trichloressigsäure sehr instabil ist. Nach ihren Untersuchungen kommt es bei Raumtemperatur innerhalb von fünfzehn Minuten zu einem NADH-Verlust von fast 57 %. In einem Gemisch mit Metaphosphorsäure ist NADH dagegen stabil. Perchlorsäure bewirkt einen Verlust von lediglich 5 % (51).

Die Instabilität von NADH wird außerdem auch durch Phosphatpuffer erhöht (74).

Nach HOHORST ist die Beständigkeit der Pyruvatkonzentration bei einem pH-Wert von 3,5 am größten. Dagegen ist Pyruvat im niedrigeren und stärker alkalischen pH-Bereich unbeständig (35). GLOSTER und HARRIS fanden in ihren Untersuchungen ähnliche Ergebnisse. Bei niedrigen pH-Werten kam es in mit Perchlorsäure enteiweißten Blutproben innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden zu keiner Änderung der Pyruvatkonzentration. Die Zugabe von Phosphatpuffer bedingte eine Konzentrationsabnahme (26).

Auch HOHORST fordert eine Pyruvatbestimmung innerhalb von zwölf Stunden nach Herstellung der Extrakte. Die Proben sollen nicht eingefroren werden, da Einfrieren und Wiederauftauen mit einem verstärkten Zerfall von Pyruvat verbunden sind (35).

PANNIER konnte in Übereinstimmung mit HOHORST feststellen, daß Lagertemperaturen von -30°C und 20°C bis 25°C zu einer Abnahme der Pyruvatkonzentration führen. Nach Untersuchungen von PANNIER ist Pyruvat bei 4°C am beständigsten. Er konnte bei dieser Lagertemperatur in einer mit Perchlorsäure enteiweißten Blutprobe bis zu 48 Stunden nach Entnahme keine Änderung der Pyruvatkonzentration feststellen (60).

Nach SEGAL kommt es bei Raumtemperatur in mit Perchlorsäure enteiweißtem Blut für mindestens 3 Stunden zu keinem Pyruvatverlust (68).

Nach Untersuchungen von MARBACH und WEIL ist Pyruvat im mit Metaphosphorsäure enteiweißten Blut für wenigstens acht Tage stabil, wenn die Proben im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei Raumtemperatur kommt es nach MARBACH und WEIL innerhalb von 6 Tagen zu keiner Änderung der Pyruvatkonzentration. Werden die Proben eingefroren, soll die Pyruvatkonzentration bis 42 Stunden unverändert bleiben (51).

LANDON weist in seinen Arbeiten darauf hin, daß während der Enteiweißung des Blutes gut gekühlt werden muß, da es sonst infolge einer Restaktivität der LDH zu einem Pyruvatverlust kommt. Ist die Enteiweißung vollständig durchgeführt, ist die Pyruvatkonzentration im Überstand für wenigstens 24 Stunden stabil. Auch während der Aufarbeitung der Proben muß nach LANDON auf gute Kühlung geachtet werden, da es bei Temperaturen über 5°C zu einem Abfall der Pyruvatkonzentration kommt. Unter 5°C war kein wesentlicher Substratverlust festzustellen (47).

Die Fragestellung zur vorliegenden methodischen Untersuchung entwickelte sich somit aus den vorstehenden unterschiedlichen Aussagen der einzelnen Autoren und speziell in unserem Arbeitskreis aus Untersuchungen der isolierten Rattenleberperfusion.

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurden die Pyruvatproben im enteweißten Zustand im Gefrierschrank für etwa drei bis vier Tage eingefroren.

Sobald eine Perfusionsreihe abgeschlossen war, wurden die Proben aufgetaut und zur Bestimmung angesetzt. Im Vergleich zu den anderen Substraten fiel auf, daß die Pyruvatwerte nicht im zu erwartenden Grenzbereich lagen, sondern erheblich um den statistischen Mittelwert streuten und somit für eine präzise Funktionsaussage nicht herangezogen werden konnten.

Da alle Bestimmungen gemäß der angewandten Bestimmungsmethode durchgeführt wurden, mußte die erhebliche Streuung der Einzelwerte durch die Art der Probenaufbewahrung verursacht werden. Damit war anzunehmen, daß es sich um einen systematischen Fehler im Sinne der Definition von Qualitätskontrollen handelte.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung zur Pyruvatbestimmung sollte es demnach sein, optimale Bedingungen für eine im steady state des Intermediärstoffwechsels vorhandene aktuelle Blutpyruvatkonzentration im Sinne einer Momentaufnahme ("Status in vivo") zu definieren.

Zur Lösung dieser Aufgabe sollen beitragen :

1. Kontrolle auf Richtigkeit und Präzision der zur Anwendung gelangten Bestimmungsverfahren "Mikromethode BOEHRINGER" und "Modifizierte Bestimmungsmethodik CZOK-LAMPRECHT" als unabdingbare Voraussetzung zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit der methodischen Grundlagen sowie zur Relevanz späterer statistischer Aussagen.

2. das Verhalten einer Pyruvatkonzentration über
die Dauer von 72 Stunden nach Blutentnahme
bei 4°C

- a) im Vollblut
- b) im sauren Überstand
- c) im neutralisierten Überstand

Bei den in dieser Arbeit angewandten Bestimmungsverfahren handelt es sich um enzymatische Nachweismethoden, die sich durch größte Spezifität auszeichnen, d. h. die Anzahl der mitreagierenden Fremdsubstrate ist sehr gering (4).

Chemischen Nachweismethoden ist anzulasten, daß ebenfalls andere Ketosäuren, z. B. α -Ketoglutarat, Acetoacetat und Oxalacetat mitreagieren und somit eine höhere Pyruvatkonzentration vorgetäuscht wird (47, 52).

3. METHODIK

3.1. Bemerkungen zur photometrischen Bestimmungsmethodik

Grundlage des optischen Testes nach WARBURG ist die Lichtabsorption eines Coenzyms, das an der Reaktion teilnimmt. Häufig wird NADH für diese Messungen verwendet. Die Aufgabe seiner oxydierten Form NAD^+ besteht in der reversiblen Aufnahme von Wasserstoff. Durch diese Wasserstoffaufnahme wird der Pyridinring des NAD^+ reduziert, so daß er nur noch zwei und nicht mehr drei Doppelbindungen enthält :

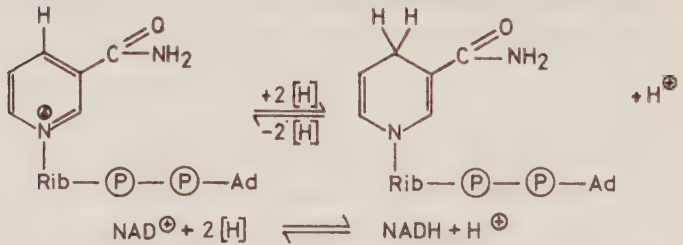


Abb. 2 : Nicotinamid-adenin-dinucleotid,
im oxydierten und reduzierten Zustand,
nach KARLSON

Der Stickstoff verliert seine positive Ladung. Dadurch wird auch die aromatische Natur des Ringes aufgehoben, wobei sich die Lichtabsorption ändert. Das Dihydropyridin-System besitzt ein breites Absorptionsmaximum bei 340 nm, während das Pyridinsystem hier nicht absorbiert. Die Abnahme der Lichtabsorption kann mit einem UV-Photometer gemessen und damit der Übergang von NADH zu NAD^+ optisch verfolgt werden.

Mißt man mit einem Photometer, dessen Filter die Quecksilberlinien 366 nm isoliert, so ist der Extinktionskoeffizient für NADH $\epsilon = 3,3 \left[\text{cm}^2/\mu\text{Mol} \right]$. Dabei ist nach HOHORST die Einhaltung einer konstanten Meßtemperatur von 25°C von größter Bedeutung für die Genauigkeit der Bestimmung, da die spezifische Absorption des NADH von der Temperatur abhängt. Bei Temperaturerniedrigung kommt es zu einer Verschiebung des NADH-Absorptionsmaximums zum Langwelligen. Die spezifische Absorption des NADH ist im pH-Bereich 7 bis 10 unabhängig vom pH-Wert (33, 34).

Pyruvat wird im neutralen pH-Bereich in der von LDH katalysierten enzymatischen Reaktion durch NADH zu Lactat reduziert :



Die Lactatdehydrogenase (LDH) hat ihr Aktivitätsoptimum im pH-Bereich 7,4 bis 7,6.

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt ganz auf der Seite des reduzierten Substrates, so daß die Konzentration des oxydierten Substrates nach dem Endwertverfahren bestimmt werden kann.

Wenn auch das Gleichgewicht weit auf der rechten Seite liegt, wird jedoch das zu bestimmende Substrat nur bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes umgesetzt. Bei der Reduzierung des Pyruvates zu Lactat sind die nicht reduzierten Pyruvatmengen aber so gering, daß sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Bei Überschuß von NADH und LDH und Einhaltung der durch den Extinktionskoeffizienten geforderten Versuchsbedingungen werden Umsätze von 98 bis 100 % erreicht (5, 18, 34, 45).

Die in dieser Arbeit verwendeten Bestimmungsmethoden sind Endwertmethoden. Bei der Reduzierung von Pyruvat zu Lactat werden stöchiometrische Mengen NADH zu NAD^+ oxydiert; bei der Reduktion von 1 Mol Pyruvat wird also 1 Mol NADH zu NAD^+ oxydiert. NAD^+ zeigt aber im Wellenbereich 300 bis 400 nm keine Absorption, so daß aus der Extinktionsabnahme die Pyruvatkonzentration errechnet werden kann (45, 46, 57, 63, 85).

3.2. Berechnung der Pyruvatkonzentration

Die Berechnung der Pyruvatkonzentration erfolgt in Anlehnung an das LAMBERT-BEER'sche Gesetz (6, 55) :

$$c = \frac{\log I_0/I}{\epsilon \cdot d} = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \left[\mu\text{Mol/ml} \right]$$

- c : Pyruvatkonzentration in $\mu\text{Mol/ml}$
 I_0 : Lichtstärke vor Eintritt in die zu bestimmende Probe
 I : Lichtstärke nach Austritt aus der zu bestimmenden Probe
 ϵ : Extinktionskoeffizient $[\text{cm}^2/\mu\text{Mol}]$
 d : Schichtdicke $[\text{cm}]$
 E : Extinktion

Da die Probe durch die verschiedenen Reagentien verdünnt wird, müssen in die obige Gleichung Verdünnungsfaktoren eingefügt werden, so daß sich folgende Formel ergibt :

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{(\text{Blut} \cdot 0,8 \cdot 1,06) + \text{HClO}_4}{\text{Blut}} \cdot \frac{\bar{U} + P}{\bar{U}} \cdot \frac{K_v}{P_v} \left[\frac{\text{mMol}}{1} \right]$$

- Blut : Blutmenge (ml)
 HClO_4 : Perchlorsäure (ml)
 $\bar{U}$: Überstand (ml)
 P : Puffer (ml)

Kv : Küvettenvolumen (ml)

Pv : Probevolumen (ml)

Soll die Konzentration nicht in mMol/l, sondern in mg/100ml angegeben werden, so ist das Molekulargewicht (MG) des Substrates zu berücksichtigen :

$$c = \frac{\Delta E \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{(\text{Blut} \cdot 0,8 \cdot 1,06) + \text{HClO}_4}{\text{Blut}} \cdot \frac{U + P}{U} \cdot \frac{Kv}{Pv} \quad \left[\frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}} \right]$$

Das Molekulargewicht von Pyruvat ist 88,1 .

Des weiteren muß bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden, daß LDH bei 366 nm Licht absorbiert. Diese Eigenextinktion wird festgestellt, indem nach abgelaufener Reaktion nochmals das Enzym zugefügt wird. Die darauf erfolgte Änderung der Extinktion wird als "Enzymsprung" bezeichnet.

Je nach dem, ob dadurch die registrierte Extinktionsdifferenz vergrößert oder verkleinert wird, muß die durch den Enzymsprung bedingte Extinktionsdifferenz subtrahiert oder addiert werden (7, 83).

3.3. Blutentnahme

Wenngleich die metabolischen Untersuchungen zu der vorliegenden methodischen Arbeit ihren Ausgang von der tierexperimentellen isolierten Leberperfusion genommen hatten, wurde bei der endgültigen Durchführung der Pyruvatbestimmungen das Blut von freiwilligen Patienten beiderlei Geschlechts herangezogen, die nach ihrem klinischen Zustand als stoffwechselgesund gelten mußten.

Insbesondere wurde darauf geachtet, daß sie klinisch und anamnestisch keine Erkrankungen aufwiesen, die zu einer Änderung der Pyruvatkonzentration führen konnten,

wie z. B. Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Lebererkrankungen, p. p. (vergl. Einleitung). In keinem Fall befand sich ein Patient im Schockzustand.

Die Patienten waren wegen traumatologischer Verletzungen in stationärer Behandlung der chirurgischen Klinik. Dabei handelte es sich im wesentlichen um einfache Extremitäten-Frakturen und Meniskopathien. Polytraumatisierte Patienten wurden ausgeschlossen.

Somit handelte es sich um ein selektiertes, weitgehend standardisiertes Patientengut.

Die Blutentnahme erfolgte am nüchternen Patienten aus den oberflächlichen Venen der Ellenbeuge (V. med. basilica, V. med. cephalica) mit einer Blutentnahmekanüle 1,1 x 30 mm und einer 20 ml Spritze der Firma BRAUN, Melsungen.

Es wurde nur kurz gestaut, und nach dem Einstich wurde die Stauung sofort gelöst. Für die Bestimmungen wurde nur ungestaut fließendes Venenblut verwendet.

3.4. Vorversuche

Die Vorversuche hatten insbesondere drei Aufgaben. Sie dienten zunächst der Einarbeitung des Untersuchers in die Untersuchungsmethoden. Dadurch sollten systematische Fehler vermieden werden, die durch mangelhafte Übung im Umgang mit Geräten und Reagentien entstehen. Da die Untersuchungen in zeitlich dichten Abständen und in relativ großer Anzahl vorgenommen werden sollten, mußten beide Bestimmungsmethoden schnell und doch mit der von den Methoden geforderten Genauigkeit durchgeführt werden.

Schon anfangs konnte festgestellt werden, daß beide Versuchsreihen - durchgeführt nach den Originalmethoden - eine zu große Blutmenge erfordert hätten.

Für die von der Firma C.F. BOEHRINGER angegebene Makromethode werden je Bestimmungsansatz 4,000 ml Blut benötigt. Daher wurden alle Volumina dieser Methode geviertelt, so daß die folgenden Bestimmungen nach der sogenannten "Mikromethode" durchgeführt wurden. Je Bestimmungsansatz sind dann nur noch 1,000 ml Blut erforderlich (73).

Für die von CZOK-LAMPRECHT angegebene Methode werden je Bestimmung 2 ml Blut benötigt (18). Für die folgenden Versuche wurden die Originalvolumina halbiert, so daß ebenfalls nur 1,000 ml Blut erforderlich waren.

Wir bezeichnen daher im Folgenden diese Methodik als "Modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT" ("Mod. Methode CZOK-LAMPRECHT").

Bei den Vorversuchen ergaben sich Schwierigkeiten mit dem von der Firma BOEHRINGER für ihre Methode gelieferten Trikaliumphosphat-Puffer. Für den Testansatz wird ein pH-Wert von 7 bis 8 gefordert (73). Dies konnten wir aber bei Enteiweißung mit einer ca. 1,0 N Perchlorsäure - wie von der Firma BOEHRINGER angegeben - nicht erreichen.

Selbst bei Herstellung des Puffers mit frischem, sterilem bidest. Wasser konnte der pH-Wert des Puffers nicht unter 12,6 gesenkt werden, so daß sich im Testansatz nicht der geforderte pH-Wert von 7 bis 8, sondern von ca. 10 ergab. Daher liefen die Reaktionen in vielen Fällen nicht ab. Nach Rücksprache mit der Versuchsteilung der Firma BOEHRINGER in Tutzing wurden daher

Versuche durchgeführt, um eine günstigere Konzentration der Perchlorsäure zu finden. Bei Verwendung einer 1,2 N Perchlorsäure zur Enteiweißung konnte im Testansatz immer ein pH-Wert von 7,4 bis 7,6 erreicht werden. Diese Werte liegen im geforderten pH-Bereich.

Zur Aufstellung eines Untersuchungsprogramms wurden fünf Versuche durchgeführt, bei denen das Verhalten der Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut, in saurer und neutralisierter wässriger Lösung über die Dauer von 72 Stunden überprüft wurde.

Es sollten Zeitabstände zwischen den einzelnen Bestimmungen ausgearbeitet werden, die eine deutlich meßbare Konzentrationsänderung gewährleisten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden folgende Zeitabstände zwischen den Bestimmungen festgelegt :

1. Bestimmungen der Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten und 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme.
2. Bestimmungen der Pyruvatkonzentration im sauren Überstand 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme.
3. Bestimmungen der Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme.

Führt man die Bestimmungen mit der Mikromethode BOEHRINGER bzw. mit der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT durch, so sind für einen Versuch - einschließlich der für Pipettierungsvorgänge benötigten Reservevolumina - ca. 28 ml Blut erforderlich. Diese Blutmenge kann mit

einer 20 ml Spritze der Firma BRAUN, Melsungen, bequem entnommen werden. Bei bis zum Anschlag herausgezogenem Kolben faßt diese Spritze ca. 29 ml Vollblut.

Aus diesen Voruntersuchungen ergab sich das folgende Aufarbeitungsschema.

3.5. Aufarbeitungsschema der Blutproben

Um eine Aussage über das Verhalten des Pyruvates im stehenden Vollblut, in sauren und neutralisierten wässrigen Lösungen machen zu können, wurde das e i n e m Patienten entnommene Blut auf drei verschiedene Arten nach dem Schema der Abb. 3 aufgearbeitet.

Alle Bestimmungen - mit Ausnahme der Simultan-Doppelbestimmungen - wurden von e i n e m Untersucher durchgeführt, um den persönlichen Fehler konstant zu halten.

E i n e m Patienten wurden ca. 29 ml Blut entnommen und schnell in heparinisierte Einmalröhrchen der Firma C.A. GREINER u. SÖHNE, Nürtingen, gefüllt.

1,000 ml Blut wurden sofort enteiweißt und zur Bestimmung des Null- oder Sofortwertes angesetzt.

Die weitere Aufarbeitung der einem Patienten entnommenen Blutprobe wurde wie folgt vorgenommen (Die genaue Methodik der Einzelbestimmungen ist dem Kapitel 3.6. "Mikromethode BOEHRINGER" bzw. 3.7. "Mod. Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT" zu entnehmen) :

3.5.1. für die Mikromethode BOEHRINGER

Außer den 1,000 ml Blut für die Bestimmung des Sofortwertes wurden ebenfalls sofort 8,000 ml Blut mit 8,000 ml 1,2 N Perchlorsäure und noch-

mals 6,000 ml Blut mit 6,000 ml 1,2 N Perchlorsäure enteiweißt.

Diese benötigten Perchlorsäuremengen wurden bereits vor Versuchsbeginn in die Einmalröhrchen der Firma C.A. GREINER u. SÖHNE, Nürtingen, gefüllt, so daß während des Versuches nur noch das Blut in die eiskalte Perchlorsäure pipettiert werden mußte.

Der durch die sofortige Enteiweißung von 8,000 ml Blut gewonnene Überstand wurde aufbewahrt.

1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 1,000 ml Überstand mit 0,500 ml Trikaliumphosphatpuffer neutralisiert und zur Bestimmung der noch vorhandenen Pyruvatkonzentration angesetzt.

Das Verhalten der Pyruvatkonzentration im sauren Überstand wurde so über die Dauer von 72 Stunden verfolgt.

Von dem Überstand, der durch die sofortige Enteiweißung von 6,000 ml Blut gewonnen wurde, wurden 4,000 ml sofort mit 2,000 ml Trikaliumphosphat-Puffer neutralisiert.

Dieser neutralisierte Überstand wurde vom sedimentierten Kaliumperchlorat abzentrifugiert und aufbewahrt.

1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 0,500 ml des neutralisierten Überstandes zur Bestimmung der noch vorhandenen Pyruvatkonzentration angesetzt.

So konnte die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand über 72 Stunden verfolgt werden.

Die restlichen ca. 13 ml Vollblut wurden ebenfalls aufbewahrt.

20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten und 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 1,000 ml Blut enteiweißt und die noch vorhandene Pyruvatkonzentration gemessen.

Auf diese Weise wurde die Pyruvatkonzentration im Vollblut über die Dauer von 72 Stunden gemessen.

3.5.2. für die mod. Bestimmungsmethodik CZOK-LAMPRECHT

Außer den 1,000 ml Blut für die Bestimmung des Sofortwertes wurden ebenfalls sofort 5,000 ml Blut mit 15,000 ml 0,6 N Perchlorsäure und nochmals 4,000 ml Blut mit 12,000 ml 0,6 N Perchlorsäure enteiweißt.

- Die benötigten Perchlorsäuremengen wurden bereits vor Versuchsbeginn in dickwandige Reagenzgläser gefüllt.

Während des Zentrifugierens bei 10.000 g erfolgte eine Polsterung mit weichen Kunststoff-Hülsen, um ein Zerschlagen der Gläser infolge der sehr starken Beschleunigungskräfte zu vermeiden.

Der durch die sofortige Enteiweißung von 5,000 ml Blut gewonnene Überstand wurde aufbewahrt.

1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 2,000 ml Überstand neutralisiert und zur Bestimmung der noch vorhandenen Pyruvatkonzentration angesetzt.

Auf diese Weise wurde die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand über die Dauer von 72 Stunden gemessen.

Von dem Überstand, der durch die sofortige Enteiweißung von 4,000 ml Blut gewonnen wurde, wurden 10,000 ml mit 0,400 - 0,440 ml 2 N KOH/2,000 ml Überstand auf einen pH-Wert von 2,5 bis 3,0 eingestellt.

Nach dem Abzentrifugieren des sedimentierten Kaliumperchlorates wurden zu 3,600 ml Probe 5,400 ml Triäthanolamin-Puffer pipettiert (0,600 ml Puffer pro 0,400 ml Probe). Dieses Gemisch aus Probe und Puffer hatte einen pH-Wert von 7,6.

1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 1,000 ml dieses neutralisierten Überstandes zur Bestimmung der noch vorhandenen Pyruvatkonzentration angesetzt. So wurde die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand über die Dauer von 72 Stunden gemessen.

Die restlichen ca. 13 ml Vollblut wurden ebenfalls aufbewahrt.

20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten und 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurden jeweils 1,000 ml Blut enteiweißt und die noch vorhandene Pyruvatkonzentration im Vollblut gemessen.

Alle Proben wurden unter standardisierten Bedingungen im Eis/Wasserbad bzw. im Kühlschrank bei 4°C in mit Kunststoff-Stopfen verschlossenen Einmalröhrchen der Firma C.A. GREINER u. SÖHNE, Nürtingen, aufbewahrt.

3.6. Mikromethode BOEHRINGER

Die Pyruvatbestimmungen wurden mit der Biochemica-Test-Combination Pyruvat, Best.-Nr. 15 973 der Firma C.F. BOEHRINGER u. SÖHNE GMBH, Mannheim, vorgenommen. Die genaue Methodik ist der Test-Fibel Beilage "Pyruvat, Enzymatische Bestimmung der Konzentration von Pyruvat im Blut", 1. Auflage 1973 zu entnehmen (73).

Für die Pyruvatbestimmungen nach dieser Methode werden folgende Reagentien benötigt :

Perchlorsäure HClO_4 , 1,2 N

Trikaliumphosphat-Puffer 0,7 M

NADH, 2,5 mM

LDH, 2 mg Protein/ml

Diese Reagentien werden von der Firma BOEHRINGER teils gebrauchsfertig geliefert, teils müssen sie durch Zugabe von frischem bidest. Wasser hergestellt werden.

Die 1,2 N-Perchlorsäure wird aus einer 70%igen Perchlorsäure, Art.-Nr. 549 der Firma MERCK, Darmstadt, hergestellt.

Dazu werden 103,12 ml der 70%igen Perchlorsäure-Lösung mit frischem bidest. Wasser in einem Meßkolben ad 1000 ml aufgefüllt.

Aus Gründen des geringeren Volumens wird der Trikaliumphosphat-Puffer in kristallinem Zustand geliefert. Die Kristalle müssen durch Zugabe von 35 ml frischem bidest. Wasser gelöst werden. Bei Raumtemperatur ist der Puffer ein Jahr haltbar.

NADH wird ebenfalls in kristallinem Zustand geliefert, da das Coenzym in Lösung bei 4°C nur vier Wochen halt-

bar ist. Die NADH-Kristalle werden durch Zugabe von 4 ml frischem bidest. Wasser gelöst. Die LDH-Suspension ist gebrauchsfertig. Bei 4°C ist sie ein Jahr haltbar.

Die Aufarbeitung der Blutproben nach der Mikromethode BOEHRINGER wird wie folgt vorgenommen (Tab. 1) :

1,000 ml Blut werden zu 1,000 ml eiskalter Perchlorsäure pipettiert und mit einem Rüttler gut durchmischt. Dadurch entsteht ein homogenes Gemisch aus Blut und Perchlorsäure, so daß der Stoffwechsel der Blutkörperchen und die Enzymaktivitäten sofort unterbrochen werden.

Nach anschließendem zehnminutigen Zentrifugieren bei 3.000 U/min wird der Überstand mit einem pH-Wert von 0,5 - 0,7 dekantiert, d.h. der Überstand wird von den abzentrifugierten zelligen Blutbestandteilen abgegossen. In einem Eppendorf-Hütchen werden zu 1,000 ml des Überstandes 0,500 ml des Trikaliumphosphat-Puffers pipettiert. Die Probe wird so auf einen pH-Wert von 7,4 bis 7,6 eingestellt. Dieser Wert entspricht dem Aktivitätsoptimum der LDH.

Nach gutem Mischen auf dem Rüttler wird die Probe für 15 Minuten in ein Eis/Wasserbad gestellt, so daß es zu einer schnellen Ausfällung des Perchlorates und Kaliums kommt.

Da beim Filtern der vielen Proben der Zeitverlust wegen der folgenden Bestimmungen zu groß gewesen wäre, wurde das ausgefallene Salz durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 12.000 U/min mit der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert.

Von diesem neutralisierten Überstand wurden vorsichtig, damit das gefällte Salz nicht wieder in Lösung ging, 0,500 ml in eine Eppendorf-Halbmikroküvette (Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$) pipettiert und gemäß den Bedingungen des Extinktionskoeffizienten auf Zimmertemperatur (25°C) gebracht.

Anschließend werden 0,050 ml NADH in die Küvette pipettiert. Der Inhalt der Küvette wird mit einem Plastikspatel gut durchgemischt, damit das Coenzym innerhalb der Küvette gleichmäßig verteilt wird. Ist dies nicht der Fall, werden infolge der Inhomogenität des Gemisches falsche Ausgangsextinktionen gemessen. Es kann dann z. B. vorkommen, daß die Ausgangsextinktion weit niedriger ist als die Endextinktion nach Reaktionsablauf.

Zur Bestimmung der Ausgangsextinktion E_1 wird die Küvette in das Photometer gegeben. Die Messung erfolgt bei Hg-Filter 366 nm und einer Temperatur von 25°C . Infolge eines noch nicht vollständig erfolgten Temperatureausgleiches oder durch das Mischen bedingter Turbulenzen kann es zunächst zu einem Ausgangsschleich kommen. Dabei nimmt die Extinktion langsam ab oder zu. Sobald die Ausgangsextinktion E_1 konstant bleibt oder sich linear ändert, wird die Reaktion durch Zugabe von 0,005 ml LDH-Suspension gestartet. Es wird abermals sorgfältig gemischt, damit sich das Enzym gleichmäßig verteilt und eine schnelle Umsetzung des Pyruvates zu Lactat erfolgt. Dabei wird NADH^+ zu NAD^+ oxydiert, so daß es zu einem Extinktionsabfall kommt, der fortlaufend mit dem Eppendorf-Kompensationsschreiber registriert wird.

Kommt die Reaktion nach ca. fünf Minuten nicht zum Stillstand, werden in Abständen drei bis fünf weitere Ablesungen vorgenommen, bis max. 15 Minuten. Zur Bestimmung von E_2 wird in diesem Falle auf die Zeit der LDH-Zugabe extrapoliert.

Dazu werden die Extinktionen in regelmäßigen Abständen abgelesen und gegen die Zeit aufgetragen. Die so erhaltene Kurve wird nach rückwärts bis zum Zeitpunkt der Enzymzugabe verlängert. Der Schnittpunkt mit der Senkrechten zu dem Zeitpunkt der Enzymzugabe gibt den richtigen Endwert E_2 und damit die wahre Extinktionsdifferenz ΔE an.

Die Gründe für den die gesamte Reaktion überlagernden Schleich, der sich meist linear mit der Zeit ändert, sind nicht immer festzustellen. Einmal kann das verwendete Enzym Aktivitäten enthalten, die andere Substrate der Probe mitreagieren lassen. Zum anderen kann das Enzym auch NADH-Oxydasen enthalten. Bei zu lange dauernden Messungen kann der Luftsauerstoff eine Spontanoxydation des NADH bewirken.

Zwischen den Zeitpunkten 0 und 4 Stunden und dann zu jedem weiteren Bestimmungszeitpunkt wurde der Enzymsprung je zweimal durchgeführt. Der Mittelwert zu jedem Zeitpunkt wurde für die Berechnung herangezogen.

Die Differenz der ermittelten Extinktionswerte E_1 und E_2 unter Berücksichtigung des Enzymsprunges dient der Berechnung der Pyruvatkonzentration.

Die Küvetten wurden sorgfältig mit bidest. Wasser gespült und mit Heißluft in einem Trockenschrank getrocknet. Vor ihrer Wiederverwendung erfolgte die Abkühlung

auf Zimmertemperatur. Ein schnelles Trocknen mit Aceton oder Alkohol wurde vermieden, da diese organischen Lösungsmittel mit NAD^+ zu reagieren vermögen (28).

3.6.1. Ermittlung des Berechnungsfaktors

Für die Mikromethode BOEHRINGER wurde der Faktor für die Berechnung der Pyruvatkonzentration nach folgender Gleichung ermittelt :

$$c = \frac{\Delta E \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{(1 \cdot 106 \cdot 08) + 1}{1} \cdot \frac{(1 + 0500)}{1} \cdot \frac{0555}{0500} \quad \left[\text{mg}/100\text{ml} \right]$$

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33 \cdot 1 \cdot 10} \cdot \frac{15385}{0500} \quad \left[\text{mg}/100\text{ml} \right]$$

$$c = \Delta E \cdot 8,21 \quad \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

Bei kleinen Werten von ΔE wurde die Extinktion gespreizt, um die Werte besser ablesen zu können. Für die Extinktionsspreizung auf das Doppelte muß der Berechnungsfaktor halbiert werden :

$$c = \Delta E \cdot 4,105 \quad \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

3.7. Modifizierte Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT

Diese Pyruvatbestimmungen wurden in Anlehnung an die von CZOK-LAMPRECHT in H.U. BERGMAYER "Methoden der enzymatischen Analyse", 3. Auflage 1974, Band II, Seite 1491ff angegebenen Methode durchgeführt (18).

Diese Methode stellt ebenfalls ein optisch-enzymatisches Nachweisverfahren dar, für das die gleichen Reaktionsmechanismen zugrunde gelegt werden können,

wie sie im Kapitel 3.1. "Bemerkungen zur photometrischen Bestimmungsmethode" dargestellt werden.

Für die Pyruvatbestimmung werden folgende Reagentien verwendet, die in den geforderten Konzentrationen eigens hergestellt werden mußten :

Perchlorsäure 0,6 N (Best.-Nr. 15902 der Firma
BOEHRINGER)

Triäthanolamin-Puffer (0,5 M; pH = 7,6; 5 mM EDTA) :

23,3 g Triäthanolamin-hydrochlorid,
Best.-Nr. 15325 der Firma BOEHRINGER,
werden in ca. 200 ml frischem bidest.
Wasser gelöst.

0,47 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Äthylendiamino-
tetraessigsäure, saures Di-Natriumsalz,
TITRIPLEX III, Best.-Nr. 8418 der Firma
MERCK, Darmstadt) werden hinzugefügt.

Mit ca. 20 ml 2N-NaOH wird ein pH-Wert
von 7,6 eingestellt. Mit frischem bidest.
Wasser wird ad 250 ml aufgefüllt.

KOH, 2 N : In einen 500 ml Meßkolben werden 56,11 g
KOH-Plätzchen, Best.-Nr. 5033 der Fir-
ma MERCK, Darmstadt, sowie frisches
bidest. Wasser eingefüllt. Sobald sich
die Plätzchen aufgelöst haben, wird mit
Aqua bidest. ad 500 ml aufgefüllt.

NADH, ca. 6 mM β - NADH :

10 mg NADH - Na_2 , Best.-Nr. 15297 der
Firma BOEHRINGER, werden abgewogen und
in 2 ml frischem bidest. Wasser gelöst.
Diese Lösung ist bei einer Aufbewahrungs-
temperatur zwischen 0°C und +5°C für
eine Woche haltbar.

LDH, 0,5 mg Protein/ml :

Die Herstellung erfolgte aus einer Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung (5 mg Protein/ml), pH ca. 7, Best.-Nr. 15371 der Firma BOEHRINGER, durch Zugabe von 0,050 ml Suspension in 0,450 ml frisches bidest. Wasser. Die benötigte LDH-Menge wurde täglich frisch hergestellt.

Aus den schon bekannten Gründen mußten die Originalvolumina dieser Methode halbiert werden. Deswegen reichten die Volumen für eine Bestimmung in Küvetten mit einer Schichtdicke von 2 cm nicht aus. Wie bei der Mikromethode BOEHRINGER wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm verwendet.

Die Pyruvatbestimmungen mit der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT wurden nach folgendem Schema durchgeführt (Tab. 1) :

1,000 ml Blut werden zu 3,000 ml eiskalter Perchlorsäure pipettiert und mit dem Rüttler gut durchmischt, damit der Stoffwechsel der Blutkörperchen und die Plasmaenzymaktivität schnell zum Erliegen kommen. Die Probe bleibt für 10 Minuten im Eis-/Wasserbad stehen und wird dann 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wird von den abzentrifugierten Zellbestandteilen dekantiert. 2,000 ml des dekantierten sauren Überstandes, pH-Wert zwischen 0,5 bis 0,8 , werden unter Kühlung und gutem Mischen mit 0,400 bis 0,440 ml 2N-KOH auf einen pH-Wert zwischen 2,5 und 3,0 eingestellt. Dadurch werden die Perchlorationen,

die selbst in großen Verdünnungen den Ablauf der Reaktion stören, gefällt (31).

Die Probe wird 10 Minuten im Eis-/Wasserbad stehen gelassen, damit Kaliumperchlorat ausfallen kann.

Zusätzlich wird das sedimentierte Kaliumperchlorat durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 3.000 U/min abzentrifugiert.

0,400 ml des Überstandes werden vorsichtig, damit der Niederschlag nicht wieder in Lösung geht, in eine Eppendorf-Halbmikroküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) pipettiert. Es folgt die Zugabe von 0,600 ml Triäthanolamin-Puffer. Dadurch wird ein pH-Wert hergestellt, bei dem die LDH ihr Aktivitätsoptimum hat und die Reduzierung des Pyruvates zu Lactat erfolgen kann. Als Coenzym und Wasserstoffdonator wird NADH benötigt. 0,020 ml NADH werden daher in die Küvette pipettiert.

Probe und Reagentien werden mit einem Plastikspatel gut durchgemischt, um eine homogene Verteilung aller Substanzen zu erreichen. Nur dann kann die Anfangsextinktion richtig gemessen werden.

Die Messung erfolgt im Photometer "Eppendorf" bei einer Meßstrahlung von 366 nm und bei einer durch den Extinktionskoeffizienten verlangten Temperatur von 25°C.

Sobald die Anfangsextinktion konstant ist oder linear abnimmt, wird die Reaktion durch Zugabe von 0,010 ml LDH gestartet. Bei der einsetzenden Reduktion des Pyruvates zu Lactat wird NADH zu NAD^+ oxydiert.

Es kommt zu einem Extinktionsabfall, der mit dem Eppendorf-Kompensationsschreiber fortlaufend aufgezeichnet

wird. Kommt die Reaktion nicht zum Stillstand, wird der Extinktionsabfall während der nächsten 25 Minuten in regelmäßigen Abständen registriert.

Es wird dann - wie schon beschrieben - auf den Zeitpunkt der LDH-Zugabe extrapoliert und E_2 bestimmt.

Zwischen den Zeitpunkten 0 und 4 Stunden und dann zu jedem weiteren Bestimmungszeitpunkt wird der Enzymsprung je zweimal durchgeführt. Der Mittelwert zu jedem Zeitpunkt wurde für die Berechnung herangezogen.

Die Differenz der ermittelten Extinktionswerte E_1 und E_2 unter Berücksichtigung des Enzymsprunges dient der Berechnung der Pyruvatkonzentration.

Alle verwendeten Küvetten wurden sorgfältig mit bidest. Wasser gespült, mit Heißluft getrocknet und vor ihrer Wiederverwendung auf Zimmertemperatur gebracht.

3.7.1. Ermittlung des Berechnungsfaktors

Für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT müssen zwei Berechnungsfaktoren - je nach verbrauchter KOH-Menge - ermittelt werden :

1) bei 0,400 ml KOH/2,000 ml Überstand
.....

$$c = \frac{\Delta E \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{(1 \cdot 106 \cdot 08) + 3 \cdot (2 + 0400)}{1 \quad 2} \cdot \frac{103}{0400} \quad \left[\frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right]$$

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33 \cdot 1 \cdot 10} \cdot \frac{95123}{0800} \quad \left[\frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right]$$

$$c = \Delta E \cdot 31,74 \quad \left[\frac{\text{mg}}{100 \text{ ml}} \right]$$

2) bei 0,440 ml KOH/2,000 ml Überstand
.....

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33 \cdot 1 \cdot 10} \cdot \frac{(1 \cdot 106 \cdot 08) + 3}{1} \cdot \frac{(2 + 0440)}{2} \cdot \frac{103}{0400} \left[\text{mg}/100\text{ml} \right]$$

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33 \cdot 10} \cdot \frac{96708}{0800} \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

$$c = \Delta E \cdot 32,27 \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

Da bei dieser Methode die Verdünnungen der Proben groß sind, werden geringe Extinktionsdifferenzen gemessen. Aus diesem Grunde wurden die Extinktionen auf das Doppelte gespreizt. Die Berechnungsfaktoren müssen dann halbiert werden.

Es ergeben sich die Formeln :

$$\text{ad 1)} : c = \Delta E \cdot 15,87 \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

$$\text{ad 2)} : c = \Delta E \cdot 16,13 \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right]$$

3.7.2. Umrechnung der Zentrifugal-Beschleunigung in U/min

Bei der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT sollen die Proben mit einer Zentrifugal-Beschleunigung von 10.000 g zentrifugiert werden.

Da auf der Zentrifugen-Skala "U/min" angegeben sind, muß die Zentrifugal-Beschleunigung (a_z) in U/min umgerechnet werden (32).

$$a_z = w^2 \cdot r$$

=====

$$w = \frac{2 \cdot \pi}{T} = 2 \cdot \pi \cdot v$$

$$v = \frac{1}{T}$$

w : Winkelgeschwindigkeit $\left[1 \text{ sec}^{-1} \right]$

T : Zeit für einen Umlauf

v : Frequenz $\left[1 \text{ sec}^{-1} \right]$

r : Radius [m] ; r = 0,10 m

$\tilde{\pi}$: 3,14

$$10.000 \text{ g} = 10.000 \cdot 9,81 \text{ m/sec}^2$$

$$98.100 \text{ m/sec}^2 = w^2 \cdot r$$

$$98.100 \text{ m/sec}^2 = w^2 \cdot 0,10$$

$$w^2 = 981.000 \text{ sec}^{-2}$$

$$w = 990,45 \text{ sec}^{-1}$$

$$2 \cdot v = 157,71 \text{ sec}^{-1}$$

$$\text{bzw. } v = \underline{9.462 \text{ U/min}}$$

3.8. Simultan-Doppelbestimmungen

Mit den vorgenannten Untersuchungen ist ein direkter Vergleich der Mikromethode BOEHRINGER und der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT nicht möglich, da in jeder Serie unterschiedliches Patientenblut untersucht wurde. Um aber die Ergebnisse aus den beiden Bestimmungsmethoden direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand in einer Probe simultan mit beiden Methoden über die Dauer von 24 Stunden untersucht.

Da die Bestimmungen einer jeden Methode als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, mußten wegen der zahlreichen Proben die Zeiten zwischen den Bestimmungzeitpunkten vergrößert werden.

Die Bestimmungen der Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut erfolgten daher 0, 40, 80, 120 Minuten und 4, 8 und 24 Stunden nach Blutentnahme.

Die Bestimmungen der Pyruvatkonzentration im sauren und neutralisierten Überstand erfolgten 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Blutentnahme.

Durch die große Anzahl der Bestimmungen bedingt, ließ es sich auch nicht vermeiden, daß die Bestimmungen einer jeden Methode von einem anderen Untersucher durchgeführt wurden. Die Ergebnisse aus beiden Bestimmungsmethoden sind also mit einem unterschiedlichen persönlichen Fehler behaftet.

Für einen Versuch wurden - einschließlich der für Pipettiervorgänge benötigten Reservevolumina - ca. 60 ml Blut benötigt.

Das Blut wurde nüchternen freiwilligen Versuchspersonen unserer Arbeitsgruppe aus oberflächlichen Venen der Ellenbeuge mit einer Blutentnahmekanüle 1,1 x 30 mm und drei 20 ml Spritzen der Firma BRAUN, Melsungen, entnommen. Die Stauung erfolgte nur kurz. Sie wurde nach dem Einstich sofort gelöst. Für die Bestimmungen wurde nur ungestaut fließendes Venenblut verwendet.

Sobald eine Spritze mit Blut gefüllt war, wurde sie durch eine leere ersetzt. Während des Spritzenwechsels verblieb die Kanüle im Venenlumen.

Die so gewonnenen dreimal 20 ml Blut wurden in einen heparinisierten 100 ml Meßzylinder gefüllt und gut gemischt, so daß man innerhalb der gesamten Blutmenge gleiche Pyruvatkonzentrationen voraussetzen konnte.

Bei diesen großen Blutmengen konnte kein Nullwert im Sinne der Momentaufnahme bestimmt werden, da die Blutentnahme mehrere Minuten in Anspruch nahm. In diesen Simultan-Doppelbestimmungen ist der "Nullwert" so definiert, daß die dafür bestimmte Blutprobe fünf Minuten nach Beginn der Blutentnahme entweißt und zur Bestimmung angesetzt wurde.

Sinn dieser Serie war es auch nicht, einen exakten Sofortwert zu erhalten, der der aktuellen Pyruvatkonzentration des Organismus entsprach, sondern aus einer Probe sollte zu gleichen Zeitpunkten die aktuelle Pyruvatkonzentration mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt werden.

Ansonsten wurden die einer Versuchsperson entnommenen Blutproben gemäß der Abb. 3 aufgearbeitet.

Die einzelnen Bestimmungen wurden entsprechend der Mikromethode BOEHRINGER und der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT durchgeführt.

Es galten auch die im Zusammenhang mit diesen Methoden beschriebenen Berechnungsfaktoren.

Um auch den persönlichen Fehler für beide Bestimmungsmethoden konstant zu halten, wurden von einem Untersucher siebzehn Pyruvatdoppelbestimmungen im Vollblut simultan mit der Mikromethode BOEHRINGER und der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT durchgeführt.

Die Blutentnahme und die Berechnung der Pyruvatkonzentrationen erfolgten wie bereits beschrieben.

3.9. Recovery-Tests

Zur weiteren Kontrolle der angewandten Methoden wurden Recovery-Tests mit einer 2,0 mM-Pyruvat-Standardlösung, Best.-Nr. 15 295 der Firma BOEHRINGER, durchgeführt.

Dabei sollte festgestellt werden, zu welchem Prozentsatz eine definierte Pyruvatmenge mit der jeweiligen Methode nachzuweisen ist.

Alle Bestimmungen wurden simultan mit beiden Methoden und jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bei jeder Methode wurden zu jedem Zwischenprodukt einer Aufarbeitungsstufe 0,030 ml bzw. 0,010 ml der Pyruvat-Standardlösung pipettiert.

Um sicher zu gehen, daß die in den Küvetten vorhandenen NADH- und LDH-Konzentrationen ausreichen, um auch die zusätzlichen Pyruvatmengen zu Lactat zu reduzieren, wurden nach Ablauf der eigentlichen Reaktion nochmals 0,010 ml Pyruvat-Standardlösung in die Küvetten pipettiert.

Es erfolgte abermals eine den 0,010 ml entsprechende Extinktionsabnahme als Zeichen dafür, daß Pyruvat zu Lactat reduziert und NADH oxydiert wurde. Diese Extinktionsabnahme war wesentlich größer als diejenige, die lediglich durch den Verdünnungseffekt erhalten wird.

Für die Mikromethode BOEHRINGER wurden 6 x 1,000 ml und für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 8 x 1,000 ml Blut je Versuch simultan enteiweißt.

Davon wurden für jede Methode je 2 x 1,000 ml Blut zur Messung der Blutpyruvatkonzentration angesetzt.

Sobald die Reaktion abgelaufen war, wurden in jede Küvette 0,010 ml der Pyruvat-Standardlösung pipettiert und der Extinktionsabfall aufgezeichnet.

Für jede Methode wurden außerdem zu je zwei entweißten - aber noch nicht zentrifugierten - Blutproben 0,030 ml Pyruvat-Standardlösung pipettiert. Um eine homogene Verteilung der zugegebenen Pyruvatmenge zu erreichen, wurden die Proben auf dem Rüttler gemischt und anschließend gemäß der jeweiligen Methodik aufgearbeitet und zur Bestimmung angesetzt.

Zum Überstand zweier weiterer Blutproben wurden je Methode ebenfalls 0,030 ml Pyruvat-Standardlösung pipettiert.

Außerdem wurden bei der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT zu dem mit 2N-KOH auf pH 2,5 bis 3,0 eingestellten Überstand 0,030 ml Standardlösung pipettiert.

Auch diese Proben wurden der jeweiligen Methodik entsprechend weiter aufgearbeitet und zur Pyruvatbestimmung angesetzt.

3.9.1. Berechnung der Pyruvatkonzentrationen

Zur Berechnung der wiedergefundenen Pyruvatkonzentration der Standardlösung wurde zunächst die Blutpyruvat-Extinktionsdifferenz von der Extinktionsdifferenz aus Blutpyruvat + Pyruvatstandardlösung subtrahiert :

$$\underline{\Delta E = \Delta E_{B+S} - \Delta E_B}$$

ΔE : Extinktionsdifferenz der Pyruvat-
Standardlösung

ΔE_{B+S} : Extinktionsdifferenz aus Blutpyruvat
und Pyruvat-Standardlösung

ΔE_B : Extinktionsdifferenz des Blutpyruvates

Die einzelnen Berechnungsfaktoren wurden nach folgenden Gleichungen errechnet :

3.9.1.1. Mikromethode BOEHRINGER

1,000 ml Blut + 0,030 ml Pyruvat-
Standardlösung

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{(1 \cdot 1,06 \cdot 0,8) + 1 + 0,030}{0,030} \cdot \frac{1,5}{1} \cdot \frac{0,555}{0,500}$$

$$c = \Delta E \cdot 278,26$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 139,13 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

1,000 ml Überstand + 0,030 ml Standard-
lösung

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{(1,5 + 0,030)}{0,030} \cdot \frac{0,555}{0,500}$$

$$c = \Delta E \cdot 151,13$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 75,56 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

0,010 ml Standardlösung in Küvette

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{(0,555 + 0,010)}{0,010}$$

$$c = \Delta E \cdot 150,84$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 75,42 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

3.9.1.2. mod. Methode CZOK-LAMPRECHT

1,000 ml Blut + 0,030 ml Standard-
lösung

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{(1 \cdot 1,06 \cdot 0,8) + 3 + 0,030}{0,030} \cdot \frac{2440}{2000} \cdot \frac{1,030}{0,400}$$

$$c = \Delta E \cdot 1084,14$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 542,07 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

2,000 ml Überstand + 0,030 ml Standard-
lösung

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{2440 + 0030}{0030} \cdot \frac{103}{0400}$$

$$c = \Delta E \cdot 565,9975$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das
Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 283,00 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

0,010 ml Standardlösung in Küvette

$$c = \frac{\Delta E \cdot 881}{33} \cdot \frac{1030 + 0010}{0010} \quad .$$

$$c = \Delta E \cdot 277,65$$

Bei Spreizung der Extinktion auf das
Doppelte ergibt sich :

$$c = \Delta E \cdot 138,82 \quad (\text{mg}/100 \text{ ml})$$

Für jede Methode wurde die wiedergefundene Kon-
zentration der Pyruvat-Standardlösung (c) durch
Multiplikation des Berechnungsfaktors mit dem
Wert ΔE errechnet.

3.10. Fehlerbreiten der Methoden

Um die Präzision und Richtigkeit der beiden angewandten Bestimmungsmethoden zu überprüfen, wurden Kontrollversuche mit einer 2,0 mM-Pyruvat-Standardlösung, Best.-Nr. 15 295 der Firma BOEHRINGER u. SÖHNE GMBH, Mannheim über die Dauer von zwei Wochen unter gleichen Bedingungen wie die regulären Versuche durchgeführt (8).

Da die regulären Versuche ebenfalls über mehrere Tage durchgeführt wurden, sollten mit den Kontrollversuchen über zwei Wochen die Präzision und Richtigkeit nicht nur innerhalb der Serie, sondern auch von Tag zu Tag überprüft werden.

Die Mengen der Standardlösung wurden so gewählt, daß die Extinktionsdifferenzen in etwa denen bei der Bestimmung von Blutpyruvat entsprachen. So war der Ablesefehler bei den Kontrollversuchen so groß wie bei der Blutpyruvatbestimmung.

Die Kontrollversuche wurden wie folgt durchgeführt :

3.10.1. Mikromethode BOEHRINGER

je Probe :

	1,000 ml	1,2 N Perchlorsäure
+	0,030 ml	2,0 mM Pyruvatstandardlösung
./.	1,000 ml	Überstand
+	1,400 ml	0,7 M Trikaliumphosphatpuffer
./.	0,500 ml	Zentrifugat
+	0,050 ml	NADH
+	0,005 ml	LDH

Nach diesem Schema wurden zwanzig Kontrollversuche durchgeführt. Die Pyruvatkonzentration der Standardlösung ist 2,0 mM. Dies entspricht einer Pyruvatkonzentration von 17,62 mg/100 ml Lösung, die bei diesen Kontrollversuchen wiedergefunden werden sollten.

Die Berechnung der Pyruvatkonzentration (c) erfolgt nach der Gleichung :

$$c = \frac{\Delta E \cdot 244,18}{\text{mg/100 ml}}$$

Bei diesen Versuchen ergaben sich folgende Ergebnisse :

Tab. 2 :

Probe	1	2	3	4	5
mg/100 ml	17,58	17,58	17,82	18,07	17,82
Probe	6	7	8	9	10
mg/100 ml	17,82	17,58	18,07	18,07	18,31
Probe	11	12	13	14	15
mg/100 ml	18,07	17,58	18,07	17,34	18,31
Probe	16	17	18	19	20
mg/100 ml	18,31	18,07	18,07	17,82	17,58

Der Mittelwert aus diesen Versuchen ist $\bar{x} = 17,90 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$. Die Standardabweichung ist $S.D. = \pm 0,29 \text{ mg/100 ml}$.

Als Maß für die Präzision der Messungen dient der Variationskoeffizient (VK), der aus der folgenden Formel errechnet wird (12, 13) :

$$VK = \pm \frac{S.D. \cdot 100}{\bar{x}} \%$$

$$VK = \pm \frac{0,29 \cdot 100}{17,90} \%$$

$$\underline{VK = \pm 1,62 \%}$$

Die Kontrolle der Richtigkeit (d) erfolgt durch die Berechnung der prozentualen Abweichung des gefundenen Wertes $\bar{x}$ vom Sollwert μ_0 nach (12, 13) :

$$d = \frac{(\mu_0 - \bar{x}) \cdot 100}{\mu_0} \%$$

$$d = \frac{(17,62 - 17,90) \cdot 100}{17,62} \%$$

$$\underline{d = 1,59 \%}$$

3.10.2. mod. Methode CZOK-LAMPRECHT

je Probe :

	2,000 ml	0,6 N Perchlorsäure
+	0,050 ml	2,0 mM Pyruvatstandardlösung
./.	2,000 ml	Überstand
+	0,650 ml	2 N KOH
./.	0,800 ml	Probe
+	1,200 ml	Triäthanolaminpuffer
+	0,040 ml	NADH
+	0,020 ml	LDH

Nach diesem Schema wurden zwanzig Kontrollversuche durchgeführt.

Die Berechnung der Pyruvat-Konzentration (c) erfolgte nach der Gleichung :

$$c = \frac{\Delta E \cdot 373,45}{\text{mg/100 ml}}$$

Bei diesen Versuchen ergaben sich folgende Ergebnisse :

Tab. 3 :

Probe	1	2	3	4	5
mg/100 ml	17,55	17,55	17,55	17,55	17,55

Probe	6	7	8	9	10
mg/100 ml	17,55	17,92	17,92	17,92	17,55

Probe	11	12	13	14	15
mg/100 ml	17,55	17,55	17,55	17,55	17,92

Probe	16	17	18	19	20
mg/100 ml	17,55	17,92	17,92	17,55	17,55

Der Mittelwert aus diesen Versuchen ist

$\bar{x} = 17,66$ mg/100 ml, die Standardabweichung

S.D. = $\pm 0,17$ mg/100 ml.

Der Variationskoeffizient (VK) als Maß für die Präzision errechnet sich nach der Gleichung :

$$VK = \pm \frac{S.D. \cdot 100}{\bar{x}} \%$$

$$VK = \pm \frac{0,17 \cdot 100}{17,66} \%$$

$$\underline{VK = \pm 0,96 \%}$$

Die Kontrolle der Richtigkeit (d) erfolgt durch Berechnung der prozentualen Abweichung des gefundenen Wertes $\bar{x}$ vom Sollwert μ_0 nach :

$$d = \frac{(\mu_0 - \bar{x}) \cdot 100}{\mu_0} \%$$

$$d = \frac{(17,62 - 17,66) \cdot 100}{17,62} \%$$

$$\underline{d = 0,23 \%}$$

3.10.3. Erläuterung der Kontrollergebnisse

Die Ergebnisse der Kontrollversuche werden in der folgenden Tabelle gegenübergestellt :

Tab. 4 :

	Mikromethode BOEHRINGER	mod. Methode CZOK-LAMPRECHT
n	20	20
$\bar{x}$	17,90	17,66
S.D.	$\pm$ 0,29	$\pm$ 0,17
VK	$\pm$ 1,62	$\pm$ 0,96
d	1,59	0,23

n : Anzahl der Versuche

$\bar{x}$: Mittelwert (mg/100 ml)

S.D. : Standardabweichung (mg/100 ml)

VK : Variationskoeffizient (%)

d : Richtigkeit (%)

In Anlehnung an die Kontrollkarte nach SHEWHART, die im engeren Sinne der Qualitätskontrolle vorbehalten ist, haben wir der besseren Übersicht wegen die Ergebnisse der Kontrollversuche ebenfalls in eine Kontrollkarte eingezeichnet, aus der die Werte für Richtigkeit und Präzision abgelesen werden können (Abb. 4 und 5).

Sind die Bestimmungen einer Methode außer Kontrolle, so bedeutet dies, daß die Ergebnisse nicht nur mit einem unvermeidbaren zufälligen Fehler, sondern auch mit systematischen Fehlern belastet sind.

Die Ergebnisse einer Bestimmungsmethode sind außer Kontrolle, wenn (12, 13) :

1. ein Wert außerhalb der 3 S.D. - Grenzen liegt,
2. sieben aufeinanderfolgende Werte über oder unter dem Sollwert liegen,
3. sieben aufeinanderfolgende Werte eine stetig ansteigende oder abfallende Tendenz zeigen.

An die Richtigkeit und den Variationskoeffizienten werden ebenfalls besondere Anforderungen gestellt.

Bei Substratbestimmungen soll der Variationskoeffizient - als Maß für die Präzision - den Wert von $\pm 5 \%$ nicht überschreiten (12, 13).

Die zulässige prozentuale Abweichung des Analyseergebnisses vom Sollwert μ_0 ist ebenfalls begrenzt.

Diese Abweichung (= Richtigkeit d) soll nicht größer sein als das Dreifache des für die gleiche Methode ermittelten Variationskoeffizienten (12, 13), also :

$$\underline{d \leq 3 \cdot VK \leq \pm 5 \% .}$$

Eine größere Versuchsanzahl wäre für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse sicher besser gewesen. In Anbetracht der weiteren Versuche zur Kontrolle der angewandten Bestimmungsmethoden und des doch recht erheblichen Aufwandes, haben wir die Versuchsanzahl von $n = 20$ für ausreichend angesehen (12).

Bei einem geforderten Sollwert $\mu_0 = 17,62 \text{ mg/100ml}$ ergibt sich durch Bestimmungen mit der Mikromethode BOEHRINGER ein gefundener Mittelwert $\bar{x} = 17,90 \text{ mg/100 ml}$. Die Standardabweichung beträgt $S.D. = \pm 0,29 \text{ mg/100 ml}$.

Der Variationskoeffizient beträgt $VK = \pm 1,62 \%$. Er liegt somit unter der geforderten Grenze von $\pm 5 \%$.

Für die Richtigkeit konnte $d = 1,59 \%$ ermittelt werden. Dieser Wert liegt ebenfalls unterhalb der zulässigen Grenze von $4,86 \%$, d.h., er ist kleiner als das Dreifache des VK.

Mit der modifizierten Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT wurde ein Mittelwert $\bar{x} = 17,66 \text{ mg/100ml}$ mit einer Standardabweichung $S.D. = 0,17 \text{ mg/100ml}$ gefunden.

Ferner konnte festgestellt werden, daß die einzelnen Werte nicht um den gefundenen Mittelwert streuten. Es konnten lediglich zwei unterschiedliche Ergebnisse errechnet werden, 17,55 mg/100 ml und 17,92 mg/100 ml. Es ist anzunehmen, daß der große Berechnungsfaktor von 373,45 eine gewisse Auf- bzw. Abrundung der gemessenen Werte bewirkte.

Der für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT errechnete Variationskoeffizient beträgt $VK = \pm 0,96 \%$. Dieser Wert liegt ebenfalls unterhalb des zulässigen Grenzwertes von $\pm 5 \%$.

Für die Richtigkeit konnte $d = 0,23 \%$ ermittelt werden. Dieser Wert ist ebenfalls kleiner als 2,88 %, d.h. kleiner als das Dreifache des VK.

Aufgrund dieser Kontrollversuche sind die Bestimmungen der beiden Methoden mit einem systematischen Fehler behaftet, der aber innerhalb der zulässigen Kontrollgrenzen liegt.

Mit der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT konnten für Präzision und Richtigkeit günstigere Werte ermittelt werden.

Für beide Methoden kann gesagt werden, daß kein Wert außerhalb der 3 S.D.-Grenzen liegt, keine sieben aufeinanderfolgenden Werte über- oder unterhalb des Sollwertes liegen und keine sieben aufeinanderfolgenden Werte eine stetig aufsteigende oder abfallende Tendenz zeigen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die zulässigen Kontrollgrenzen von keiner der beiden Bestimmungsmethoden überschritten wurden.

3.11. Verwendete Geräte

Die Extinktionsänderungen wurden mit dem Photometer "Eppendorf" und dem Kompensationsschreiber 6511 der Firma NETHELER und HINZ GMBH, Hamburg aufgezeichnet. Zur Einhaltung einer Meßtemperatur von 25°C wurden die Küvetten innerhalb des Photometers in temperierbare Halter gesteckt, die an einen Thermostaten angeschlossen waren.

Für alle Pipettievorgänge wurden Mikropipetten "Marburg" derselben Firma verwendet.

Sämtliche Reagentien - soweit sie der Hersteller nicht schon gebrauchsfertig lieferte - wurden mit der Präzisionswaage der Firma SARTORIUS, Göttingen, Typ-Nr. 2472 abgewogen.

Zur guten Durchmischung von Substrat und Reagentien wurden ein Rüttler, Cat.-Nr. 34524-200 und ein Magnetrührer, Cat.-Nr. 18 851-017 der Firma CENCO INSTRUMENTEN MU.N.V., Breda, Niederlande verwendet.

Für die Pyruvatbestimmung nach der von BOEHRINGER angegebenen Methode wurden die Zentrifuge der Firma HERAEUS CHRIST GMBH, Typ 001 und die "Eppendorf"-Zentrifuge 3200 der Firma NETHELER und HINZ GMBH, Hamburg verwendet.

Für die Pyruvatbestimmung nach der von CZOK-LAMPRECHT angegebenen Methodik wurde zusätzlich eine Ultrazentrifuge der Firma MSE, Typ High Speed 18 benötigt. Diese Zentrifuge ermöglicht eine Kühlung der Proben während des Zentrifugierens.

Der pH-Wert wurde mit dem pH-Meter der Firma CORNING-EEL, Modell 12 bestimmt. Vor jeder Messung wurde das pH-Meter mit einem Puffer, $\text{pH} : 7,00 \pm 0,01$ bei 25°C , Cat.-Nr. 477070 derselben Firma geeicht.

Für die Rechenvorgänge - soweit sie nicht im Rechenzentrum der Philipps-Universität Marburg an der Lahn durchgeführt wurden - fanden die Rechner "Combitron S + dilector" der Firma DIEHL, Nürnberg und der Firma CORVUS, Modell Nr. 0300 Verwendung.

3.12. Statistische Berechnungen

Die Meßwerte der vorliegenden Untersuchungen wurden statistisch ausgewertet (14, 17, 19, 20, 44, 84).

Folgende statistische Rechenverfahren kamen dabei zur Anwendung :

Arithmetisches Mittel $\bar{x}$

$$\text{Formel : } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Standardabweichung S.D.

$$\text{Formel : S.D.} = \pm \sqrt{\left[\frac{1}{n-1} \right] \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]}$$

x_i = Meßwerte ($i = 1, 2, \dots, n$)

n = Anzahl der Meßwerte

Bei den Untersuchungsreihen "Pyruvat im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand" (vergl. METHODIK 3.5.), gemessen mit der Mikromethode BOEHRINGER und der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT, wurden die Mittelwerte mit Hilfe von Varianzanalyse und DUNCAN-Test verglichen.

Die Differenz der Mittelwerte war bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5\%$ signifikant.

Ferner kamen zur Anwendung der t-Test für korrelierende Daten sowie der t-Test für nicht korrelierende Daten.

Mit Hilfe des t-Testes für nicht korrelierende Daten wurden die Mittelwerte, nach der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT einerseits und der Mikromethode BOEHRINGER andererseits, miteinander verglichen. Diese Werte wurden bei einem unterschiedlichen Patientengut gemessen.

Die Ergebnisse der Pyruvatbestimmungen nach beiden Methoden wurden ferner bei einem einheitlichen Patientengut überprüft.

Dies erfolgte in den Untersuchungsreihen der Simultan-Doppelbestimmungen und der Recovery-Tests.

Da in diesem Fall das Patientengut bei beiden Bestimmungsmethoden einheitlich war, konnte der t-Test für korrelierende Daten angewendet werden.

An dieser Stelle sei den Damen und Herren aus dem Institut für Medizinisch-Biologische Statistik, besonders Herrn Dr. med. HIMMELMANN, für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn P. ZÖFEL aus dem Rechenzentrum der Philipps-Universität Marburg an der Lahn für die Durchführung der statistischen Berechnungen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Mikromethode BOEHRINGER

Nach dem Aufarbeitungsschema der Abb. 3 wurde mit der Mikromethode BOEHRINGER das Verhalten der Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand überprüft.

Insgesamt wurden zwölf Versuche durchgeführt. Bei zwei Versuchen fehlen Einzelwerte, so daß diese bei der statistischen Auswertung mit Varianzanalyse und anschließend dem DUNCAN-Test nicht berücksichtigt werden konnten.

4.1.1. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut

In dieser Untersuchungsreihe wurde die Pyruvatkonzentration im bei 4° C aufbewahrten Vollblut über die Dauer von 72 Stunden nach Blutentnahme gemessen.

Die Ergebnisse sind in der Tab. 5a zusammengefaßt. Ihre graphische Darstellung erfolgt in der Abb. 6. In der Tab. 5b werden die einzelnen Werte aus den zehn Versuchen auf ihre Signifikanz verglichen.

Die Ausgangswerte der Proben, innerhalb einer Minute nach Blutentnahme enteivweißt, schwanken zwischen 0,40 mg und 0,98 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut. Als Mittelwert ergibt sich eine Pyruvatkonzentration von 0,611 mg/100 ml mit einer Standardabweichung S.D. = $\pm 0,17$ mg/100 ml.

Anschließend nimmt die Konzentration in den bis zur achten Stunde untersuchten Proben fortlaufend ab.

Wie aus der Abb. 6 hervorgeht, ist der Konzentrationsabfall in den ersten zwanzig Minuten am steilsten.

Nach 20 Minuten sind nur noch 0,434 mg/100 ml bzw. 71,03 % des Ausgangswertes vorhanden. Ausgangswert und 20 Minuten-Wert unterscheiden sich daher signifikant auf dem 1%-Niveau.

Auch bis zur vierzigsten Minute ist noch ein starker Konzentrationsverlust festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt sind 0,336 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut vorhanden. Das sind 54,99 % des Ausgangswertes. Der 40 Minuten-Wert unterscheidet sich zu dem Ausgangswert als auch zu dem 20 Minuten-Wert signifikant auf dem 1%-Niveau.

Zum Zeitpunkt sechzig Minuten sind von der Ausgangskonzentration 0,276 mg/100 ml bzw. 45,17 % vorhanden. Dieser Wert unterscheidet sich statistisch signifikant zum Ausgangswert und auch zum 20 Minuten-Wert ($p < 0,01$). Gegenüber dem 40 Minuten-Wert besteht keine Signifikanz ($p > 0,05$).

Nach sechzig Minuten nimmt die Pyruvatkonzentration langsamer ab. Bis zur achten Stunde ist der Konzentrationsabfall nahezu linear, d.h. in gleicher Zeit nimmt die Konzentration um gleiche Werte ab.

Zu den Zeitpunkten 80, 100, 120 Minuten und 4 Stunden werden 0,251 mg/100 ml, 0,232 mg/100 ml, 0,201 mg/100 ml und 0,156 mg/100 ml gemessen. Dies sind 41,08 %, 37,97 %, 32,90 % und 25,53 % der Ausgangskonzentration.

Der 80 Minuten-Wert unterscheidet sich signifikant vom 4 h-Wert auf dem 1%-Niveau. Zwischen dem 100 Minuten- und dem 4 h-Wert besteht ein signifikanter Unterschied auf dem 5%-Niveau.

Zu dem Zeitpunkt acht Stunden wird die niedrigste Pyruvatkonzentration während der gesamten Versuchsdauer gemessen.

Die mittlere Pyruvatkonzentration beträgt 0,130 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Standardabweichung S.D. = $\pm 0,03$ mg/100 ml am kleinsten. Die Einzelwerte schwanken zwischen 0,08 mg/100 ml und 0,20 mg/100 ml.

Nach der achten Stunde der Aufbewahrung kommt es im Vollblut bei 4° C zu einem Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration.

Zu dem Zeitpunkt vierundzwanzig Stunden beträgt die Konzentration 0,168 mg/100 ml, zum Zeitpunkt achtundvierzig Stunden 0,258 mg/100 ml. Der 48 h-Wert unterscheidet sich signifikant vom 8 h-Wert ($p < 0,01$).

Zweiundsiebzig Stunden nach Blutentnahme kann eine Pyruvatkonzentration von 0,240 mg/100 ml gemessen werden. Von der achtundvierzigsten bis zur zweiundsiebzigsten Stunde nach Blutentnahme kommt es damit zu einem geringen, nicht signifikanten ($p > 0,05$) Konzentrationsabfall.

4.1.2. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand

In dieser Untersuchungsreihe wurde das Blut nach Entnahme sofort enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vom Niederschlag dekantiert und aufbewahrt.

In diesem Überstand wurde die Pyruvatkonzentration 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme gemessen.

Der pH-Wert des Überstandes schwankte zwischen 0,5 und 0,7.

Die Ergebnisse dieser Reihe sind in der Tab. 6a zusammengefaßt. Die graphische Darstellung erfolgt in der Abb. 7. In der Tab. 6b werden die einzelnen Mittelwertsunterschiede statistisch miteinander verglichen (DUNCAN-Test).

Bis zur achten Stunde nach Blutentnahme können gegenüber dem Ausgangswert von 0,611 mg/100 ml $\pm 0,17$ keine statistisch signifikanten Konzentrationsunterschiede nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Innerhalb dieser Zeitspanne schwanken die Werte der definierten Bestimmungszeitpunkte zwischen 0,607 mg/100 ml und 0,582 mg/100 ml bzw. zwischen 99,35 % und 95,25 % der Ausgangskonzentration.

Im einzelnen werden folgende Konzentrationen gemessen : 1h-Wert : 0,596 mg/100 ml, 2h-Wert : 0,582 mg/100 ml, 4h-Wert : 0,607 mg/100 ml, 8h-Wert : 0,592 mg/100 ml.

Erst nach acht Stunden kommt es zu einem signifikanten Abfall der Pyruvatkonzentration.

Vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme sind von der Ausgangskonzentration nur noch 0,521 mg/100 ml bzw. 85,27 % vorhanden. Ausgangswert und 24 h-Wert unterscheiden sich daher signifikant auf dem 1%-Niveau.

Auch zwischen dem 8 h- und dem 24 h-Wert besteht ein signifikanter Unterschied bezüglich der Pyruvatkonzentration ($p < 0,01$).

Die 48 h- und die 72 h-Werte unterscheiden sich ebenfalls signifikant, sowohl zum Ausgangs-, als auch zum 8 h-Wert auf dem 1%-Niveau.

Achtundvierzig Stunden nach Blutentnahme sind noch 0,519 mg/100 ml bzw. 84,94 % der Ausgangskonzentration vorhanden.

Zu dem Zeitpunkt zweiundsiebzig Stunden können 0,496 mg/100 ml bzw. 81,18 % nachgewiesen werden.

4.1.3. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand

In dieser Untersuchungsreihe wurde das Blut nach Entnahme sofort enteiweißt. Der durch Zentrifugieren gewonnene Überstand wurde durch Zugabe des Trikaliumphosphat-Puffers auf einen pH-Wert von 7,4 bis 7,6 eingestellt.

Dieser neutralisierte Überstand wurde aufbewahrt und die noch vorhandene Pyruvatkonzentration 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme gemessen.

Die Einzelergebnisse dieser Reihe können der Tab. 7a entnommen werden. In der Abb. 8 wird der Abfall der Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand graphisch dargestellt. Die Ergeb-

nisse der statistischen Auswertung mit Varianzanalyse und anschließendem DUNCAN-Test finden sich in der Tab. 7b.

Während der gesamten Versuchsdauer von zweiundsiebzig Stunden fällt die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand kontinuierlich ab. Innerhalb der ersten zwei Stunden ist der Konzentrationsverlust am größten. Danach nimmt die Konzentration langsamer ab. Man kann dann von einem nahezu linearen Abfall sprechen.

Von der Ausgangskonzentration 0,611 mg/100 ml $\pm$ 0,17 sind nach einer Stunde nur noch 0,524 mg/100 ml vorhanden. Das sind 85,76 % des Ausgangswertes.

Zwei Stunden nach Blutentnahme sind im neutralisierten Überstand 0,462 mg/100 ml bzw. 75,61 %, nach vier Stunden 0,397 mg/100 ml bzw. 64,98 %, nach acht Stunden 0,311 mg/100 ml bzw. 50,90 %, nach vierundzwanzig Stunden 0,195 mg/100 ml bzw. 31,91 %, nach achtundvierzig Stunden 0,131 mg/100 ml bzw. 21,44 % und nach zweiundsiebzig Stunden 0,090 mg/100 ml bzw. 14,73 % des Ausgangswertes vorhanden.

Mit Ausnahme des 48 h- und des 72 h-Wertes unterscheiden sich alle zu den definierten Zeitpunkten untersuchten Pyruvatkonzentrationen untereinander statistisch signifikant auf dem 1%- oder 5%-Niveau.

Im Vergleich zum Abfall des Pyruvates im Vollblut ist festzustellen, daß die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand langsamer abnimmt.

Im Vollblut sind nach einer Stunde nur noch 0,276 mg/100 ml vorhanden, während im neutralisierten Überstand 0,524 mg/100 ml gemessen werden können.

Zwei Stunden nach Blutentnahme sind im Vollblut 0,201 mg Pyruvat pro 100 ml Blut vorhanden. Zum gleichen Zeitpunkt sind im neutralisierten Überstand 0,462 mg/100 ml nachzuweisen.

Die 4 h-Werte betragen 0,156 mg/100 ml im Vollblut bzw. 0,397 mg/100 ml im neutralisierten Überstand, die 8 h-Werte 0,130 mg/100 ml bzw. 0,311 mg/100 ml.

Ferner ist im neutralisierten Überstand zu keinem Zeitpunkt ein Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration zu beobachten.

4.2. Modifizierte Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT

Mit der mod. Bestimmungsmethode CZOK-LAMPRECHT wurden nach dem Aufarbeitungsschema der Abb. 3 elf Versuche durchgeführt, mit denen die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand über die Dauer von 72 Stunden gemessen wurde.

Bei der statistischen Auswertung mit Varianzanalyse und anschließendem DUNCAN-Test konnte ein Versuch nicht berücksichtigt werden, da bei diesem ein Einzelwert fehlt.

Die Versuche wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die nach der Mikromethode BOEHRINGER.

4.2.1. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut

Es wurde die Pyruvatkonzentration im bei 4° C bzw. im Eis-/Wasserbad aufbewahrten heparini-

sierten Vollblut über die Versuchsdauer von 72 Stunden gemessen.

Die einzelnen Bestimmungen erfolgten 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten und 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind in der Tab. 8a zusammengefaßt. Die graphische Darstellung der während der Versuchsdauer vorhandenen Pyruvatkonzentration erfolgt in der Abb. 9. In der Tab. 8b werden die Ergebnisse mit Varianzanalyse und DUNCAN-Test statistisch ausgewertet.

Die Ausgangs- bzw. Nullwerte der Proben, innerhalb einer Minute nach Blutentnahme enteiweißt, schwanken zwischen 0,39 mg/100 ml und 0,95 mg/100 ml. Als Mittelwert ergibt sich eine Konzentration von 0,641 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut. Die Standardabweichung beträgt S.D. = $\pm 0,17$ mg/100 ml.

Bis zur achten Stunde nach Blutentnahme nimmt die Pyruvatkonzentration fortlaufend ab.

Innerhalb der ersten zwanzig Minuten kommt es zum größten Konzentrationsverlust. Zu dem Zeitpunkt zwanzig Minuten nach Blutentnahme sind 0,515 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut vorhanden. Das sind 80,34 % des Ausgangswertes. Infolge des starken Pyruvatverlustes unterscheiden sich Ausgangs- und 20 Minuten-Wert statistisch signifikant auf dem 1%-Niveau.

Auch innerhalb der nächsten zwanzig Minuten ist noch eine starke Konzentrationsabnahme festzustellen.

Vierzig Minuten nach Blutentnahme sind nur noch 0,422 mg/100 ml bzw. 65,83 % der Ausgangskonzentration vorhanden. 20 Minuten- und 40 Minuten-Wert unterscheiden sich ebenfalls signifikant auf dem 1%-Niveau.

Sechzig Minuten nach Blutentnahme können mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,354 mg/100 ml gemessen werden. Das sind 55,23 % der Pyruvatausgangskonzentration. Der 60 Minuten-Wert unterscheidet sich zu dem Ausgangs- und 20 Minuten-Wert signifikant auf dem 1% und zu dem 40 Minuten-Wert auf dem 5%-Niveau.

Nach dem Zeitpunkt sechzig Minuten nimmt die Pyruvatkonzentration langsamer ab. Bis zur achten Stunde erfolgt eine nahezu lineare Konzentrationsabnahme.

Innerhalb dieser Zeitspanne nimmt die Konzentration zwischen sechzig und achtzig Minuten um 11,30 %, zwischen achtzig und einhundert Minuten um 10,19 %, zwischen einhundert und einhundertzwanzig Minuten um 10,64 %, zwischen einhundertzwanzig Minuten und vier Stunden um 17,86 % und zwischen vier und acht Stunden um 17,87 % ab.

Dementsprechend sind zu den Zeitpunkten achtzig Minuten 0,314 mg/100 ml, zum Zeitpunkt einhundert Minuten 0,282 mg/100 ml, zum Zeitpunkt zwei Stunden 0,252 mg/100 ml und zum Zeitpunkt vier Stunden 0,207 mg/100 ml vorhanden.

Der 80 Minuten-Wert unterscheidet sich bezüglich der Pyruvatkonzentration vom 4 h-Wert auf dem

1%-Niveau. 100 Minuten- und 4 h-Wert unterscheiden sich ebenfalls signifikant ($p < 0,05$).

Die niedrigste mittlere Pyruvatkonzentration während der gesamten Versuchsdauer wird acht Stunden nach Blutentnahme gemessen.

Sie beträgt 0,170 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut. Die Standardabweichung zu diesem Zeitpunkt ist S.D. = $\pm 0,04$ mg/100 ml. Zwischen 0,10 mg/100 ml und 0,25 mg/100 ml schwanken die Einzelwerte. 2 h- und 8 h-Wert unterscheiden sich signifikant auf dem 1%-Niveau.

Nach der achten Stunde kommt es zu einem Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration.

Vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme können 0,262 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut gemessen werden, so daß sich 8 h- und 24 h-Wert statistisch signifikant auf dem 1%-Niveau unterscheiden.

Achtundvierzig und zweiundsiebzig Stunden nach Blutentnahme sind 0,328 mg/100 ml und 0,373 mg/100 ml vorhanden. 24 h- und 48 h-Wert unterscheiden sich signifikant auf dem 5%-Niveau. Der geringe Konzentrationsanstieg zwischen den Zeitpunkten achtundvierzig und zweiundsiebzig Stunden ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.2.2. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand

In dieser Untersuchungsreihe wurde das Blut nach Entnahme sofort enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vom Niederschlag dekantiert und im KÜHLSCHRANK bei 4° C bzw. im Eis-/Wasserbad aufbewahrt.

Der pH-Wert des Überstandes schwankte zwischen 0,5 und 0,8.

Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurde die in diesem Überstand vorhandene Pyruvatkonzentration gemessen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind in der Tab. 9a zusammengefaßt, deren graphische Darstellung in der Abb. 10 erfolgt. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mit Varianzanalyse und anschließendem DUNCAN-Test können der Tab. 9b entnommen werden.

Innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme können gegenüber dem Ausgangswert 0,641 mg/100 ml keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$).

In dieser Zeitspanne schwanken die Werte zwischen 0,646 mg/100 ml und 0,633 mg/100 ml bzw. zwischen 100,78 % und 98,75 % der Ausgangskonzentration. Zu den definierten Zeitpunkten können im einzelnen folgende Werte gemessen werden :

1 h-Wert : 0,633 mg/100ml, 2 h-Wert : 0,635 mg/100ml,
4 h-Wert : 0,646 mg/100ml, 8 h-Wert : 0,636 mg/100ml,
24 h-Wert : 0,633 mg/100ml

Aufgrund der statistischen Auswertung kann gesagt werden, daß im sauren Überstand innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden weder ein Anstieg noch eine Abnahme der Pyruvatkonzentration erfolgt.

Achtundvierzig Stunden nach Blutentnahme sind nur noch 0,591 mg/100 ml bzw. 92,20 % der Ausgangs-

konzentration vorhanden. Damit unterscheiden sich 24 h- und 48 h-Wert statistisch signifikant auf dem 5%-Niveau.

Zu dem Zeitpunkt zweiundsiebzig Stunden können 0,587 mg/100 ml bzw. 91,58 % des Ausgangswertes nachgewiesen werden. Dieser geringe Konzentrationsabfall zwischen den Zeitpunkten achtundvierzig und zweiundsiebzig Stunden ist nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.2.3. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand

Für diese Untersuchungsreihe wurde das entnommene Blut sofort enteiweißt. Der durch Zentrifugieren gewonnene und dekantierte Überstand wurde sofort durch Zugabe des Triäthanolamin-Puffers auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt.

Dieser neutralisierte Überstand wurde aufbewahrt.

1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme wurde die noch vorhandene Pyruvatkonzentration gemessen.

Die Einzelergebnisse dieser Serie sind in der Tab. 10a zusammengefaßt. Ihre graphische Darstellung erfolgt in der Abb. 11. Die Ergebnisse werden mit Varianzanalyse und anschließendem DUNCAN-Test ausgewertet. Die Werte können der Tab. 10b entnommen werden.

Von der Ausgangskonzentration 0,641 mg/100 ml sind nach einer Stunde 0,604 mg/100 ml bzw. 94,23 % vorhanden. Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Durch die Methodik bedingt, kann die Probe frühestens fünfundzwanzig Minuten nach Blutentnahme mit dem Triäthanolamin-Puffer neutralisiert werden. Während dieser Zeit besteht ein saures Milieu, so daß es zu einer geringeren Konzentrationsabnahme kommt.

Zwei Stunden nach Blutentnahme sind von der Ausgangskonzentration nur noch 0,508 mg/100 ml bzw. 79,25 % vorhanden. Damit unterscheidet sich der 2 h-Wert statistisch signifikant vom Ausgangswert auf dem 1%-Niveau und vom 1 h-Wert auf dem 5%-Niveau.

Nach zwei Stunden fällt die Pyruvatkonzentration im mit Triäthanolamin-Puffer neutralisierten Überstand so langsam ab, daß lediglich zwischen übernächsten Zeitpunkten signifikante Konzentrationsunterschiede gemessen werden können.

Acht Stunden nach Blutentnahme sind 0,425 mg/100ml bzw. 66,30 % der Ausgangskonzentration vorhanden. Zwischen 2 h- und 8 h-Wert besteht ein signifikanter Unterschied auf dem 5%-Niveau.

Zu dem Zeitpunkt vier Stunden können 0,473 mg/100ml bzw. 73,79 % und zum Zeitpunkt vierundzwanzig Stunden können 0,348 mg/100 ml bzw. 54,29 % nachgewiesen werden. Diese Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

Achtundvierzig Stunden nach Blutentnahme werden 0,312 mg/100 ml bzw. 48,67 % gemessen. Dieser und der 8 h-Wert unterscheiden sich statistisch signifikant auf dem 1%-Niveau.

Zu dem Zeitpunkt 72 Stunden sind 0,297 mg/100 ml vorhanden. Das sind 46,33 % der Ausgangskonzentration.

Die Pyruvatkonzentration nimmt im neutralisierten Überstand langsamer ab als im Vollblut.

Nach einer Stunde sind im Überstand 0,604 mg/100 ml vorhanden, während im Vollblut zu diesem Zeitpunkt 0,354 mg/100 ml nachzuweisen sind.

Zwei Stunden nach Blutentnahme sind im neutralisierten Überstand 0,508 mg/100 ml vorhanden bzw. 0,252 mg/100 ml im Vollblut.

Zum Zeitpunkt vier Stunden werden im Überstand 0,473 mg/100 ml und im Vollblut 0,207 mg/100 ml gemessen.

Die 8 h-Werte betragen 0,425 mg/100 ml bzw. 0,170 mg/100 ml.

Ferner ist im neutralisierten Überstand zu keinem Zeitpunkt ein Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration zu beobachten.

4.3. Vergleich der Ergebnisse aus beiden Bestimmungsmethoden

In den Abbildungen 12, 13 und 14 werden die Mittelwerte aus den je zehn Versuchen synoptisch dargestellt.

Diese Mittelwerte werden mit dem t-Test nach STUDENT miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung können der Tab. 11 entnommen werden. In dieser Tabelle wird die Irrtumswahrscheinlichkeit α für einen angenommenen Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden angewandten Bestimmungsmethoden angegeben. Die Ergebnisse unterscheiden sich statistisch signifikant, wenn $\alpha \leq 5\%$ ist.

Zunächst werden die Mittelwerte aus den Pyruvatbestimmungen im Vollblut verglichen :

Bei sofortiger Enteiweißung des entnommenen Blutes ergibt sich nach der Mikromethode BOEHRINGER für die Ausgangskonzentration ein Mittelwert von 0,611 mg/100 ml mit einer Standardabweichung S.D. = $\pm$ 0,17 mg/100 ml.

Nach der mod. Methodik CZOK-LAMPRECHT ergibt sich für die Ausgangskonzentration ein Mittelwert von 0,641 mg/100 ml mit einer Standardabweichung S.D. = $\pm$ 0,17 mg/100 ml.

Zu diesem Zeitpunkt besteht für einen angenommenen Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 69,97 %.

Zu den Zeitpunkten vier, acht, vierundzwanzig und zweiundsiebzig Stunden kann zwischen den Mittelwerten der beiden Pyruvat-Bestimmungsmethoden ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Vier Stunden nach Blutentnahme werden mit der Mikromethode BOEHRINGER 0,156 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut gemessen und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,207 mg/100 ml. Damit ergibt sich zu diesem Zeitpunkt für die Irrtumswahrscheinlichkeit ein Wert von α = 4,62 %.

Acht Stunden nach Blutentnahme werden 0,130 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,170 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) gemessen. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit wird α = 3,65 % errechnet.

Zu dem Zeitpunkt vierundzwanzig Stunden können im Vollblut Pyruvatkonzentrationen von 0,168 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,262 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) festgestellt werden (α = 0,39 %) und nach zweiundsiebzig Stunden 0,240 mg/100 ml und 0,373 mg/100 ml (α = 1,59 %).

Für die Pyruvatkonzentrationen im sauren Überstand kann zu den definierten Zeitpunkten zwischen den beiden Methoden kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Werte der Irrtumswahrscheinlichkeit schwanken zwischen 9,93 % und 69,97 %.

Vergleicht man die Pyruvatkonzentrationen im neutralisierten Überstand miteinander, so fällt auf, daß diese unterschiedlich schnell abnehmen.

In dem mit Trikaliumphosphat-Puffer neutralisierten Überstand der Mikromethode BOEHRINGER fällt die Pyruvatkonzentration so schnell ab, daß es zwischen jedem der einzelnen Bestimmungszeitpunkte zu einem signifikanten Konzentrationsabfall kommt. Die Werte unterscheiden sich signifikant auf dem 1%- oder 5%-Niveau. Nach zweiundsiebzig Stunden können von der Ausgangskonzentration 0,611 mg/100 ml nur noch 0,090 mg/100 ml bzw. 14,73 % nachgewiesen werden.

In dem mit Triäthanolamin-Puffer neutralisierten Überstand der mod. Methodik CZOK-LAMPRECHT nimmt die Pyruvatkonzentration langsamer ab, so daß nur zwischen den übernächsten Bestimmungszeitpunkten signifikante Unterschiede festgestellt werden können. Nach zweiundsiebzig Stunden sind von der Ausgangskonzentration 0,641 mg/100 ml noch 0,297 mg/100 ml bzw. 46,33 % vorhanden.

Vergleicht man die Mittelwerte der Pyruvatkonzentrationen im neutralisierten Überstand, so kann zu den Zeitpunkten vierundzwanzig, achtundvierzig und zweiundsiebzig Stunden ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($\alpha < 5 \%$).

Vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme werden mit der Mikromethode BOEHRINGER 0,195 mg/100 ml und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,348 mg/100 ml gemessen. Es ergibt sich für die Irrtumswahrscheinlichkeit ein Wert von $\alpha = 2,21 \%$.

Die 48 h-Werte betragen 0,131 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,312 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT). Die Irrtumswahrscheinlichkeit für diesen Zeitpunkt beträgt $\alpha = 2,04 \%$.

Für den Zeitpunkt zweiundsiebzig Stunden ergibt sich $\alpha = 1,25 \%$. Die gemessenen Konzentrationen betragen 0,090 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,297 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT).

Ferner kann festgestellt werden, daß alle mit der Mikromethode BOEHRINGER gemessenen Pyruvatkonzentrationen - im Vollblut, sauren und neutralisierten Überstand - niedriger sind als die mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT gemessenen Konzentrationen.

In der Tabelle 12 werden die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen als prozentuale Werte gegenübergestellt. Die graphische Darstellung dieser Werte erfolgt in den Abbildungen 15 bis 17.

4.4. Simultan-Doppelbestimmungen

Um die Ergebnisse beider Bestimmungsmethoden direkt miteinander vergleichen zu können, wurde in dieser Serie die Pyruvatkonzentration im Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand in einer Probe mit beiden Methoden über die Dauer von vierundzwanzig Stunden untersucht.

Die Pyruvatbestimmungen im Vollblut wurden 0, 40, 80, 120 Minuten und 4, 8 und 24 Stunden nach Blutentnahme vorgenommen.

Die Pyruvatbestimmungen im sauren und neutralisierten Überstand erfolgten 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Blutentnahme.

Die Bestimmungen einer jeden Methode wurden von einem anderen Untersucher durchgeführt.

Insgesamt wurden in dieser Serie zwei Versuche durchgeführt.

Die Ergebnisse der beiden Versuche können der Tab. 13 entnommen werden. Angegeben sind die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen.

Bei Vergleich der Ergebnisse fällt auf, daß auch in dieser Serie die Werte der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT höher liegen als die der Mikromethode BOEHRINGER.

Im Versuch Nr. 21 ergeben sich als Ausgangswerte für die Mikromethode BOEHRINGER 0,670 mg/100 ml und für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,765 mg/100 ml.

Die dann erfolgende Konzentrationsabnahme im Vollblut entspricht der in den vorgenannten Versuchen.

Im einzelnen werden im Vollblut zu den definierten Bestimmungszeitpunkten folgende Pyruvatkonzentrationen gemessen :

40 Minuten-Wert : 0,400 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,470 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT),
80 Minuten-Wert : 0,280 mg/100 ml und 0,385 mg/100 ml,
2 h-Wert : 0,205 mg/100 ml und 0,270 mg/100 ml, 4 h-Wert:
0,100 mg/100 ml und 0,185 mg/100 ml

Zu dem Zeitpunkt acht Stunden nach Blutentnahme sind im Vollblut 0,040 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) und 0,160 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) vorhanden.

Danach steigt die Pyruvatkonzentration entsprechend den vorausgegangenen Versuchen wieder an. Vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme werden mit der Mikromethode BOEHRINGER 0,230 mg/100 ml und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,395 mg/100 ml gemessen.

Im sauren Überstand schwankt die Pyruvatkonzentration innerhalb des Bestimmungszeitraumes von vierundzwanzig Stunden zwischen 0,670 mg/100 ml und 0,560 mg/100 ml (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. 0,765 mg/100 ml und 0,715 mg/100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT).

Im neutralisierten Überstand fällt die Pyruvatkonzentration entsprechend den vorausgegangenen Versuchen unterschiedlich schnell ab.

In dem mit Trikaliumphosphat-Puffer neutralisierten Überstand der Mikromethode BOEHRINGER fällt die Pyruvatkonzentration innerhalb von vierundzwanzig Stunden von 0,670 mg/100 ml auf 0,075 mg/100 ml ab.

Zu den definierten Zeitpunkten werden folgende Einzelwerte gemessen :

1 h-Wert : 0,620 mg/100 ml, 2 h-Wert : 0,500 mg/100 ml,
4 h-Wert : 0,405 mg/100 ml, 8 h-Wert : 0,280 mg/100 ml,
24 h-Wert : 0,075 mg/100 ml

Im mit Triäthanolamin-Puffer neutralisierten Überstand der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT fällt die Pyruvatkonzentration im gleichen Zeitraum von 0,765 mg/100 ml auf 0,290 mg/100 ml ab.

Es werden folgende Einzelwerte gemessen :

1 h-Wert : 0,740 mg/100 ml, 2 h-Wert : 0,640 mg/100 ml,
4 h-Wert : 0,605 mg/100 ml, 8 h-Wert : 0,475 mg/100 ml,
24 h-Wert : 0,290 mg/100 ml

Entsprechende Werte ergeben sich aus dem Versuch Nr. 22 :

Als Ausgangskonzentration werden mit der Mikromethode
BOEHRINGER 0,565 mg/100 ml und mit der mod. Methode
CZOK-LAMPRECHT 0,655 mg/100 ml gemessen.

Im Vollblut fällt die Pyruvatkonzentration bis zur
achten Stunde nach Blutentnahme fortlaufend ab. Zu die-
sem Zeitpunkt werden mit der Mikromethode BOEHRINGER
0,015 mg Pyruvat pro 100 ml Vollblut nachgewiesen und
mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,080 mg/100 ml.

Die Einzelwerte bis zur achten Stunde können der Tab. 13
entnommen werden.

Zwischen den Zeitpunkten acht und vierundzwanzig Stunden
kommt es auch in diesem Versuch zu einem Wiederanstieg
der Pyruvatkonzentration.

Die 24 h-Werte betragen für die Mikromethode BOEHRINGER
0,170 mg/100 ml und für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT
0,160 mg/100 ml.

Im sauren Überstand schwankt die Pyruvatkonzentration
zwischen 0,565 mg/100 ml und 0,400 mg/100 ml (Mikro-
methode BOEHRINGER) bzw. 0,655 mg/100 ml und 0,505 mg/
100 ml (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT).

Im neutralisierten Überstand fällt die Pyruvatkonzen-
tration von 0,565 mg/100 ml auf 0,075 mg/100 ml ab
(Mikromethode BOEHRINGER). Mit der mod. Methode CZOK-
LAMPRECHT können von der Ausgangskonzentration

0,655 mg/100 ml nach vierundzwanzig Stunden noch
0,290 mg/100 ml nachgewiesen werden.

Die Einzelwerte zu den definierten Zeitpunkten können
der Tab. 13 entnommen werden.

Die Ergebnisse aus den beiden Versuchen wurden
statistisch ausgewertet.

Zunächst erfolgte die Prüfung der Werte auf Normalver-
teilung. Dann wurden die Werte mit dem t-Test für
abhängige Stichproben untersucht. Wenn die dabei ermit-
telte Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5\%$ ist, unter-
scheiden sich zwei Werte statistisch signifikant.

Zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Pyruvat-
konzentrationen im stehenden Vollblut, im sauren und
neutralisierten Überstand konnte ein signifikanter
Unterschied errechnet werden ($\alpha < 0,1$).

Um auch für beide Bestimmungsmethoden den persönlichen
Fehler konstant zu halten, wurden von einem
Untersucher siebzehn Pyruvat-Doppelbestimmungen im
Vollblut simultan mit beiden Methoden
durchgeführt.

Die Einzelwerte dieser Serie sind in der Tab. 14 gegen-
übergestellt.

Nach der Mikromethode BOEHRINGER ergibt sich aus den
siebzehn Doppelbestimmungen ein Mittelwert von 0,291 mg/
100 ml und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT ein
Mittelwert von 0,303 mg/100 ml.

Diese Werte werden auf einen signifikanten Unterschied
untersucht. Für einen angenommenen Unterschied zwischen
den Ergebnissen der beiden Methoden kann eine Irrtums-
wahrscheinlichkeit von $\alpha = 37,8\%$ errechnet werden.

4.5. Recovery-Tests

In dieser Serie sollte festgestellt werden, zu welchem Prozentsatz eine definierte Pyruvatmenge mit der jeweiligen Methodik nachzuweisen ist.

Bei jeder Methode wurden zu jedem Zwischenprodukt einer Aufarbeitungsstufe 0,030 ml bzw. 0,010 ml der Pyruvat-Standardlösung pipettiert.

Ansonsten wurden die einzelnen Proben der jeweiligen Methodik entsprechend aufgearbeitet.

Von den 0,030 ml einer 2,0 mM Pyruvat-Standardlösung, die zu 1,000 ml Blut pipettiert wurden - einige Minuten nach der Enteiweißung, um sicher zu gehen, daß Erythrocyten-Stoffwechsel und Plasmaenzymaktivität zum Erliegen gekommen waren - konnten mit der Mikromethode BOEHRINGER 89,508 % nachgewiesen werden.

Wurden 0,030 ml der Standardlösung zu 1,000 ml Überstand pipettiert, konnten 82,372 % wiedergefunden werden.

Von den 0,010 ml Pyruvat-Standardlösung, die nach abgelaufener Reaktion direkt in die Kuvette pipettiert wurden, konnten 76,578 % nachgewiesen werden.

Mit der modifizierten Bestimmungsmethodik CZOK-LAMPRECHT wurden günstigere Werte erreicht.

Die zu 1,000 ml Blut - zehn Minuten nach Enteiweißung - pipettierten 0,030 ml einer 2,0 mM Pyruvat-Standardlösung konnten zu 99,990 % nachgewiesen werden.

Wurden diese 0,030 ml zu 2,000 ml Überstand pipettiert, betrug die Wiederfindungsrate 99,916 %.

Pipettiert man 0,030 ml Standardlösung zehn Minuten nach KOH-Zugabe zum Überstand, so lassen sich 104,402 % nachweisen.

Von den 0,010 ml Pyruvat-Standardlösung, die nach abgelaufener Reaktion direkt in die Küvette gemischt wurden, konnten 96,902 % nachgewiesen werden.

Die Werte der Wiederfindungsraten wurden statistisch ausgewertet (Tab. 15a, 15b).

Zunächst erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung. Mit dem t-Test für abhängige Stichproben wurden die Ergebnisse auf einen signifikanten Unterschied geprüft. Dieser ist vorhanden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5 \%$.

Vergleicht man die Werte der Wiederfindungsraten der Pyruvat-Standardlösung im Vollblut - 89,508 % für die Mikromethode BOEHRINGER und 99,990 % für die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT -, so läßt sich für einen angenommenen Unterschied in den Ergebnissen der beiden Methoden eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 22,9 \%$ errechnen.

Von den 0,030 ml der Pyruvat-Standardlösung, die in den sauren Überstand pipettiert wurden, konnten mit der Mikromethode BOEHRINGER 82,372 % und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 99,916 % nachgewiesen werden. Für diese beiden Werte läßt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied errechnen ($\alpha = 7,8 \%$).

Wurden 0,010 ml der Pyruvat-Standardlösung in die Küvette pipettiert, so konnten mit der Mikromethode BOEHRINGER 76,578 % und mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 96,902 % wiedergefunden werden. Damit ergibt sich für einen angenommenen Unterschied zwischen diesen beiden Werten eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 6,7 \%$.

Die jeweiligen Mittelwerte der Wiederfindungsraten der beiden Bestimmungsmethoden werden in den Tab. 15a und 15b gegenübergestellt.

5. DISKUSSION

5.1. Unterschiedliche Verfahren zur Pyruvatbestimmung

Seit Pyruvat erstmals von BERZELIUS 1835 beschrieben wurde, sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, um den neu entdeckten Metaboliten sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmen zu können.

1931 konnte WENDEL in einer Zusammenfassung dieser Bestimmungsverfahren nicht weniger als fünfzig verschiedene Methoden bzw. Modifikationen nachweisen (80).

Vor Einführung der heute gebräuchlichen enzymatischen Nachweisverfahren erfolgte die Bestimmung mit chemischen Methoden, so z. B. mit 2-4-Dinitrophenylhydrazin.

Bei diesem Verfahren kondensiert Pyruvat im alkalischen Milieu mit dem 2-4-Dinitrophenylhydrazin unter Bildung des roten bzw. braunen Dinitrophenylhydrazons. Aufgrund der auftretenden Farbintensität kann die Pyruvatkonzentration errechnet werden (2, 10, 11, 23, 24, 29, 30, 47, 69).

Dieses Bestimmungsverfahren ist aber nicht spezifisch für Pyruvat, sondern für die Keto-Gruppe allgemein. Es reagieren ebenfalls andere Ketosäuren, z. B. α -Keto-glutarat, Acetoacetat und Oxalacetat und täuschen so eine zu hohe Pyruvatkonzentration vor (23, 24, 29, 30, 48, 54).

Um die Spezifität der Bestimmungsmethoden zu erhöhen, wurde das chemische Nachweisverfahren modifiziert.

Am häufigsten wurde die von FRIEDEMANN und HAUGEN modifizierte 2-4-Dinitrophenylhydrazin-Methode zur Pyruvatbestimmung angewandt (3, 23, 24, 47).

Diese Autoren empfehlen, den durch die Enteiweißung des Blutes gewonnenen Überstand lediglich fünf Minuten mit 2-4-Dinitrophenylhydrazin reagieren zu lassen, da innerhalb dieser Zeit fast ausschließlich Pyruvat mit dem Hydrazinreagens reagiert. Die Extraktion des Pyruvat-Hydrazons erfolgt mit Toluol, Xylol oder Benzol, da diese Substanzen nach FRIEDEMANN und HAUGEN für Pyruvat sehr spezifisch sind und mehr als 90 % des Pyruvates aus dem Reaktionsgemisch extrahieren.

Weitere Modifikationen, die dazu dienten, die Spezifität der Bestimmungen zu erhöhen, wurden u.a. von BARRENSCHEEN und DREGUSS (2), BUEDING und WORTIS (11), LONG (49), LU (50) und NISHIMURA (58) entwickelt.

STRAUB glaubte, die Spezifität der Pyruvatbestimmung durch Verwendung von Salicylaldehyd in alkalischer Lösung erhöhen zu können. Auch dieses Verfahren wurde von einigen Autoren modifiziert (30, 70).

Diese Methoden waren jedoch entweder zu aufwendig, oder die Ergebnisse noch zu ungenau.

CAVALLINI und Mitarbeiter entwickelten daher eine Methode, Pyruvat mit Hilfe der Papierchromatographie zu bestimmen (15, 16).

Mit diesem Verfahren wurde auch die Spezifität der Dinitrophenylhydrazin-Methode überprüft.

EL HAWARY und THOMPSON fanden bei Bestimmungen mit der nicht modifizierten Dinitrophenylhydrazin-Methode erheblich höhere Werte als bei chromatographischen Bestimmungen (3).

Diesen Unterschied konnte auch CAVALLINI bei seinen Untersuchungen mit der Papierchromatographie feststellen.

Seine Werte lagen um ca. $\frac{2}{3}$ niedriger als die Ergebnisse, die sich mit Hilfe der nach LONG modifizierten 2-4-Dinitrophenylhydrazin-Methode ergaben (16).

1936 entdeckten WARBURG und CHRISTIAN die Reaktion
 $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \text{ (45).}$

Diese Reaktion bildet die Grundlage für die heute gebräuchliche optisch-enzymatische Nachweisreaktion des Pyruvates.

Nach Angaben von HOHORST haben KUBOWITZ und OTT erstmals dieses Verfahren zur praktischen Anwendung empfohlen (33, 45).

Die Ergebnisse der Pyruvatbestimmungen durch BAUER mit Hilfe enzymatischer Messungen lagen um 30 % bis 40 % niedriger als die bei chemischen Bestimmungsmethoden gemessenen Werte von FRIEDEMANN und HAUGEN.

Um festzustellen, ob die enzymatische Methode nur einen Teil des Pyruvates erfaßt, gab er eine genau abgewogene Pyruvatmenge zusätzlich zum Filtrat. Diese konnte er mit der optisch-enzymatischen Nachweismethode zu 96 % bis 103 % wiederfinden.

Daher ermöglicht nach BAUER der optische Enzymtest eine selektivere Erfassung des Pyruvates (3).

Jedoch ist auch die enzymatische Methode nicht absolut spezifisch für Pyruvat, da auch β -Hydroxypyruvat, Thiopyruvat und Glyoxylsäure mit vergleichbarer Geschwindigkeit von kristallisierter LDH umgesetzt werden (22, 25, 36, 48, 52, 53, 54).

Nach BERGMAYER ist aber die Spezifität enzymatischer Nachweismethoden sehr gut, da Enzyme die derzeit spezifischsten Reagentien sind (4).

Aus diesem Grunde haben wir für die eigenen vorliegenden Untersuchungen optisch-enzymatische Bestimmungsmethoden gewählt.

5.2. Pyruvat-Normalwerte durch eigene Untersuchungen

Die in der eigenen Arbeit gemessenen Normalwerte der Pyruvatkonzentrationen stimmen mit den in der Literatur veröffentlichten Werten gut überein.

Zehn Pyruvatbestimmungen ergaben bei Messungen mit der Mikromethode BOEHRINGER venöse Konzentrationen zwischen 0,40 mg/100 ml und 0,98 mg/100 ml, wobei lediglich drei Werte größer als 0,60 mg/100 ml waren. Als Mittelwert dieser Messungen konnte eine Pyruvatkonzentration von 0,611 mg/100 ml bei einer Standardabweichung $S.D. = \pm 0,17$ mg/100 ml errechnet werden.

In Messungen bei zehn anderen Patienten mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT schwankten die Konzentrationen zwischen 0,39 mg/100 ml und 0,95 mg/100 ml bei einem Mittelwert von 0,641 mg/100 ml und einer Standardabweichung von $S.D. = \pm 0,17$ mg/100 ml.

Damit stimmen die eigenen Ergebnisse mit denen von SEGAL in etwa überein (68).

Verglichen mit den zum Teil unter Grundumsatzbedingungen gemessenen Werten der anderen Autoren fällt eine nur leichte Erhöhung der eigenen Werte auf. Dies ist darauf zurückzuführen, daß zu diesen Untersuchungen zwar das Blut von nüchternen Patienten herangezogen wurde, die Messungen von uns aber nicht unter Grundumsatzbedingungen durchgeführt werden konnten, so daß leicht erhöhte Konzentrationen vorgefunden werden mußten. Diese Beobachtung erfolgt in Übereinstimmung mit HUCKABEE.

HUCKABEE konnte feststellen, daß Pyruvatbestimmungen bei Bettruhe unter Grundumsatzbedingungen die niedrigsten Werte ergeben. Während der Bettruhe fällt die Pyruvatkonzentration ab. Nach etwa einer Stunde stellt sich der konstant bleibende niedrigste Wert ein (38).

Selbst durch geringe Muskelaktivität wird die Pyruvatkonzentration beeinflusst. BAUER fand bei einer Versuchsperson ungestaut eine Pyruvatkonzentration von 0,44 mg/100 ml. Durch Stauung und Faustschluß stieg die Konzentration auf 0,77 mg/100 ml. Erfolgt Stauung und Faustschluß über vier Minuten, so stieg die Pyruvatkonzentration auf 1,16 mg/100 ml an (3).

5.3. Die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut

Nach Blutentnahme kommt es im stehenden Vollblut sofort zu Veränderungen der Pyruvatkonzentration ("alterierter Status", HOHORST).

0 - 8 h nach Entnahme :

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch Messungen mit der Mikromethode BOEHRINGER zunächst ein Konzentrationsabfall von 0,611 mg/100 ml über 0,276 mg/100 ml nach einer Stunde auf 0,130 mg/100 ml nach acht Stunden gemessen werden. Das sind 45,17 % bzw. 21,28 % der Ausgangskonzentration (Tab. 5a, 5b, 12; Abb. 6).

Mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT konnte ein Konzentrationsabfall von 0,641 mg/100 ml über 0,354 mg/100 ml (55,23 % der Ausgangskonzentration) nach einer Stunde auf 0,170 mg/100 ml (26,52 % der Ausgangskonzentration) nach acht Stunden festgestellt werden (Tab. 8a, 8b, 12; Abb. 9).

Innerhalb der ersten Stunde nach Blutentnahme ist somit in beiden Nachweisverfahren der Abfall der Pyruvatkonzentration am steilsten.

Auch BUEDING und WORTIS konnten bereits eine Minute nach Blutentnahme einen signifikanten Abfall der Pyruvatkonzentration feststellen, wenn das entnommene Blut bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde (11).

Innerhalb von dreißig Minuten nach Blutentnahme konnten Verluste zwischen 15 % und 50 % beobachtet werden (30).

Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut überein. Zwanzig Minuten nach Blutentnahme konnten mit der Mikromethode BOEHRINGER 71,03 % und nach vierzig Minuten 54,99 % der Ausgangskonzentration gemessen werden (Tab. 12).

Die entsprechenden Werte der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT liegen mit 80,34 % und 65,83 % etwas höher (Tab. 12).

Bei Lagerung des heparinisierten Vollblutes in Ölsuspension und einer Temperatur von -10° C konnte HUCKABEE eine wesentlich langsamere Konzentrationsabnahme feststellen.

Der Pyruvatverlust betrug drei Minuten nach Blutentnahme 6,5 %, nach sieben Minuten 9,1 % und nach dreißig Minuten nur 14,3 % (37).

Damit ist anzunehmen, daß diese Art der Lagerung eine Hemmung der LDH-Aktivität bewirkt.

Acht Stunden nach Blutentnahme sind nach den eigenen vorliegenden Ergebnissen von der Ausgangskonzentration nur noch 21,28 % (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. 26,52 % (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) vorhanden (Tab. 12).

Zu einem weiteren Abfall kommt es dann in unserer Versuchsanordnung nicht mehr.

Dieser rasche Konzentrationsabfall des Pyruvates im stehenden Vollblut kann als aktive Stoffwechselleistung der Erythrocyten betrachtet werden (56, 82).

Nach WALLER verfügen frisch entnommene Erythrocyten vorwiegend über die cytoplasmatischen Enzyme der Glycolyse, so daß ihr Stoffwechsel vorwiegend glykolytischer Natur ist (78).

Dieser Autor konnte an gewaschenen Erythrocyten, die bei 37°C in Phosphat-Ringerlösung, pH 7,4 mit Zusatz von 0,01 Mol Glucose/L im Warburg-Apparat geschüttelt wurden, in einer Stunde eine Pyruvatbildung von 1,9 Mikromol/ 10^{11} Erythrocyten messen. Die Lactatbildung in einer Stunde betrug jedoch 38,4 Mikromol/ 10^{11} Erythrocyten.

Der Lactatanteil ist also etwa 20fach höher als der des Pyruvates.

Unter den eigenen Versuchsbedingungen lagen anaerobe Verhältnisse vor, da das Blut sofort nach Entnahme in Röhrchen abgefüllt wurde. Es ist anzunehmen, daß der rasche Abfall der Pyruvatkonzentration, insbesondere in der ersten Stunde nach Blutentnahme, auf einer aktiven Verschiebung des Redox-Verhältnisses zur reduzierten Seite beruht.

8 - 48 h nach Entnahme :

Mit der Mikromethode BOEHRINGER kann zwischen den Zeitpunkten 8h und 48 h nach Blutentnahme ein signifikanter Wiederanstieg ($p < 0,01$) der Pyruvatkonzentration gemessen werden.

Dieser ist durch Messungen mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT bereits zwischen den Zeitpunkten 8h und 24h festzustellen ($p < 0,01$).

Diese Beobachtung steht in Einklang mit Befunden anderer Autoren.

So wurde festgestellt, daß durch diesen Anstieg der Pyruvatkonzentration Werte erreicht werden können, die über der Ausgangskonzentration liegen (10).

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von HENLEY und Mitarbeitern darin überein, daß der Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration nach acht Stunden erfolgt (29).

REDETZKI und Mitarbeiter stellten dagegen bis zu sechs Stunden nach Blutentnahme einen Abfall der Pyruvatkonzentration im heparinisierten Vollblut fest, dem dann ein Wiederanstieg bis zu vierundzwanzig Stunden nach Entnahme folgte (62).

Der Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration ist möglicherweise durch das Zusammenwirken der folgenden Reaktionsschritte zu erklären (10, 27, 30) :

- (1) Pyruvat + Triosephosphat $\rightleftharpoons$ Lactat + 3-Phosphoglycerat
- (2) 3-Phosphoglycerat $\rightleftharpoons$ 2-Phosphoglycerat $\rightleftharpoons$ Phosphopyruvat
→ Pyruvat

Das Ergebnis der Reaktion (1), deren Gleichgewicht weit auf der rechten Seite liegt, ist ein Verlust von Pyruvat. Durch die Reaktion (2) wird dann wieder Pyruvat gebildet.

Jedenfalls fanden wir in den dieser Arbeit zugrundeliegenden und zitierten Literaturstellen für diese Beobachtung des Pyruvatwiederanstiegs keine weitere Erklärungsmöglichkeit.

5.4. Die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand

In dieser Untersuchungsreihe wurde die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand über die Dauer von zweiundsiebzig Stunden gemessen.

Der Überstand der Mikromethode BOEHRINGER hatte einen pH-Wert von 0,5 bis 0,7, der der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT 0,5 bis 0,8.

Wird das Blut nach Entnahme sofort enteiweißt, findet der Abfall der Pyruvatkonzentration, wie er im heparinisierten Vollblut gemessen werden konnte, nicht statt.

Während der ersten acht Stunden nach Blutentnahme ist im sauren Überstand mit den beiden angewandten Bestimmungsmethoden kein signifikanter Abfall der Pyruvatkonzentration nachweisbar.

Mit der Mikromethode BOEHRINGER (Tab. 6a, 6b, 12; Abb.7) kann erst zwischen den Zeitpunkten 8h und 24h gegenüber der Ausgangskonzentration 0,611 mg/100 ml ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) nachgewiesen werden.

Möglicherweise ist dieser signifikante Abfall durch den starken Konzentrationsverlust bedingt, der im Versuch Nr. 2 zwischen den Zeitpunkten 8h und 24h gemessen werden kann. Es ist anzunehmen, daß es sich hier um einen sogenannten "Ausreißer" handelt.

Nach vierundzwanzig Stunden sind von der Ausgangskonzentration mit 0,521 mg/100 ml noch 85,27 % vorhanden.

Mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT können im Unterschied zur Mikromethode BOEHRINGER erst nach vierundzwanzig Stunden signifikante Unterschiede gegenüber dem Sofortwert nachgewiesen werden (Tab. 9a, 9b, 12; Abb. 10).

Die Konzentrationen des 24h- und 48h-Wertes unterscheiden sich auf dem 5%-Niveau ($p < 0,05$).

Von der Ausgangskonzentration in Höhe von 0,641 mg/100 ml sind nach achtundvierzig Stunden mit 0,591 mg/100 ml noch 92,20 % vorhanden.

Diese Feststellung, daß die Pyruvatkonzentration im sauren Überstand für mindestens acht bzw. vierundzwanzig Stunden unverändert bleibt, kann in Übereinstimmung mit einigen Autoren getroffen werden.

Auch GLOSTER, HARRIS und LANDON konnten im Überstand, der durch die Enteiweißung des Blutes mit Perchlorsäure gewonnen wurde, innerhalb eines Zeitraumes von vierundzwanzig Stunden keine Änderung der Pyruvatkonzentration feststellen (26, 47).

Aufgrund seiner Untersuchungen fordert HOHORST eine Bestimmung des Pyruvates innerhalb von zwölf Stunden nach Herstellung der Extrakte, damit Verfälschungen der Ergebnisse durch Veränderungen der Konzentration vermieden werden (35).

Werden die mit Perchlorsäure enteiweißten Blutproben bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so soll die Pyruvatkonzentration für mindestens drei Stunden unverändert bleiben (68).

PANNIER gibt dagegen eine etwas längere Zeitspanne an, in der keine Änderungen der Pyruvatkonzentration gemessen werden kann. Dieser Autor hat das entnommene Blut mit Perchlorsäure enteiweißt und den Überstand bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Bis zu achtundvierzig Stunden nach Entnahme konnte PANNIER keine Konzentrationsabnahme feststellen (60).

Dagegen werden von MARBACH und WEIL wesentlich längere Zeiträume angegeben, wenn das Blut mit Metaphosphorsäure enteiweißt wird. Wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt, konnte im Überstand für wenigstens acht Tage keine Abnahme der Pyruvatkonzentration gemessen werden (51).

Als Ursache der Konzentrationsabnahme im sauren Überstand werden unterschiedliche Ursachen diskutiert.

Zunächst besteht die Möglichkeit, daß Pyruvat zu Lactat reduziert wird, obwohl die LDH fehlt.

Enzyme sind jedoch Katalysatoren, d.h., sie beschleunigen die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes. Bei Fehlen des Enzymes bedeutet dies aber nicht unbedingt, daß die Reaktion nicht ablaufen kann. Es dauert nur länger, bis das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist.

GLOSTER und HARRIS vermuten, daß die LDH-Aktivität durch die Enteiweißung mit Perchlorsäure nicht vollständig unterbunden wird. Die LDH-Aktivität soll nach Meinung dieser Autoren lediglich durch den niedrigen pH-Wert gehemmt werden (26).

Damit ist anzunehmen, daß Pyruvat auch innerhalb der ersten acht bzw. vierundzwanzig Stunden im sauren Überstand zu Lactat reduziert wird. Diese Reaktion läuft jedoch wesentlich langsamer ab als im Vollblut, so daß nach acht bzw. vierundzwanzig Stunden gegenüber der Ausgangskonzentration noch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden kann.

Erst zu den Zeitpunkten 24h bzw. 48h ist die Reduzierung des Pyruvates soweit fortgeschritten, daß die Veränderung meßbar wird.

Zwischen dann folgenden Bestimmungszeitpunkten kann keine weitere signifikante Konzentrationsabnahme gemessen werden.

Damit ist anzunehmen, daß zu diesen Zeitpunkten das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist. Dieses liegt als Folge des sehr niedrigen pH-Wertes weit auf der Seite des Pyruvates; es werden nur geringe Mengen Pyruvat zu Lactat reduziert.

Zu den genannten Zeitpunkten wurden daher lediglich 14,73 % (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. 7,80 % (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) der Pyruvat-Ausgangskonzentration bis zur Gleichgewichtseinstellung reduziert (Tab.12).

Als eine weitere Ursache der Konzentrationsabnahme des Pyruvates in wässrigen Lösungen wird die Polymerisation diskutiert. Durch die Zusammenlagerung von Molekülen wird Pyruvat enzymatisch nicht mehr nachweisbar, so daß ein Konzentrationsverlust vorgetäuscht wird.

STRUCK konnte dies zeigen, indem er zwei Pyruvat-Bestimmungsmethoden, nämlich eine radioaktive und eine enzymatische, bei seinen Untersuchungen anwandte (71).

Auch WENDEL berichtet in seinen Arbeiten von der Möglichkeit, daß Pyruvat zu polymerisieren vermag (80).

5.5. Die Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand

Im neutralisierten Überstand nimmt die Pyruvatkonzentration kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer von zweiundsiebzig Stunden ab.

Dabei nimmt die Konzentration des Pyruvates in dem mit Trikaliumphosphat-Puffer der Mikromethode BOEHRINGER neutralisierten Überstand schneller ab als in dem Überstand, der mit Triäthanolamin-Puffer der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT neutralisiert wurde.

Mit der Mikromethode BOEHRINGER (Tab. 7a, 7b, 12; Abb.8) können daher zwischen den einzelnen Bestimmungszeit-

punkten - mit Ausnahme zwischen den 48h- und 72h-Werten - signifikante Unterschiede bezüglich der Pyruvatkonzentration gemessen werden ($p < 0,01$ oder $p < 0,05$).

Gegenüber den gemessenen Werten im Vollblut, ist im neutralisierten Überstand eine wesentlich langsamere und gleichmäßigere, beinahe lineare, Abnahme der Pyruvatkonzentration festzustellen.

Eine Stunde nach Blutentnahme sind im stehenden heparinisierten Vollblut von der Ausgangskonzentration 0,611 mg/100 ml mit 0,201 mg/100 ml nur noch 32,90 % vorhanden. Im neutralisierten Überstand können dagegen zu diesem Zeitpunkt mit 0,524 mg/100 ml noch 85,76 % nachgewiesen werden.

Diese Differenz bleibt in etwa auch während der folgenden sieben Stunden bestehen. Zum Zeitpunkt 8h werden daher im Vollblut 21,28 % der Ausgangskonzentration gemessen, während im neutralisierten Überstand noch 50,90 % vorhanden sind.

Im Gegensatz zur Pyruvatkonzentration im Vollblut erfolgt im neutralisierten Überstand kein Wiederanstieg. Dagegen kommt es zu einem weiteren signifikanten Abfall bis zu achtundvierzig Stunden nach Entnahme. Es ist anzunehmen, daß zu diesem Zeitpunkt der Gleichgewichtszustand der Reaktion erreicht ist, da bis zum Zeitpunkt 72 h kein weiterer signifikanter Konzentrationsabfall gemessen werden kann.

Weniger schnell erfolgt der Pyruvatabfall in dem Überstand, der mit Triäthanolamin-Puffer der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT neutralisiert wurde (Tab. 10a, 10b, 12; Abb. 11).

Zwischen den Zeitpunkten 1 h und 2 h nach Blutentnahme kann ein signifikanter Konzentrationsabfall ($p < 0,05$) gemessen werden. Ansonsten besteht im Gegensatz zu den Werten, die mit der Mikromethode BOEHRINGER gefunden wurden, nur zwischen den Übernächsten Bestimmungszeitpunkten ein signifikanter Unterschied auf dem 1% oder 5%-Niveau ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

Auch in dieser Untersuchungsreihe nimmt die Pyruvatkonzentration im stehenden Vollblut schneller ab als im neutralisierten Überstand. Mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT wurde eine Ausgangskonzentration von 0,641 mg/100 ml gemessen.

Davon sind im Vollblut nach einer Stunde mit 0,354 mg/100 ml nur noch 55,23 % vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt können im neutralisierten Überstand noch 0,604 mg/100 ml bzw. 94,23 % gemessen werden.

Sowohl im stehenden Vollblut als auch im neutralisierten Überstand kommt es bis zur achten Stunde nach Blutentnahme zu einem weiteren Abfall der Pyruvatkonzentration. Zu diesem Zeitpunkt können im Vollblut mit 0,170 mg/100 ml nur noch 26,52 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden, dagegen im neutralisierten Überstand 66,30 % bzw. 0,425 mg/100 ml.

Anschließend fällt die Konzentration des Pyruvates im neutralisierten Überstand weiter ab, während sie im Vollblut ansteigt. Zum Zeitpunkt 48 h werden daher im neutralisierten Überstand mit 0,312 mg/100 ml 48,67 % der Ausgangskonzentration gemessen ($p < 0,01$).

Da die Konzentration des Pyruvates im neutralisierten Überstand schneller abnimmt als im sauren, ist anzunehmen, daß die LDH im physiologischen pH-Bereich des neutralisierten Überstandes wieder aktiv wird.

Diese Auffassung vertreten auch GLOSTER und HARRIS. Im sauren Überstand konnten sie während einer Zeitspanne von vierundzwanzig Stunden keine Konzentrationsabnahme des Pyruvates feststellen. Bei Zugabe von Phosphatpuffer konnte aber ein Pyruvatabfall gemessen werden. Nach Meinung dieser Autoren wird die Aktivität der LDH durch die Enteiweißung mit Perchlorsäure lediglich gehemmt. Wird aber durch Zugabe des Phosphatpuffers ein physiologischer pH-Bereich hergestellt, so kann die LDH wieder aktiv werden. Dies bedingt eine Konzentrationsabnahme, da Pyruvat zu Lactat reduziert wird (26).

5.6. Folgerungen aus den Ergebnissen der Pyruvatkonzentrationen im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand

Vergleicht man die Pyruvatkonzentrationen im stehenden heparinisierten Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand über die Versuchsdauer von zweiundsiebzig Stunden, so läßt sich feststellen, daß diese im sauren Überstand am stabilsten ist.

Diese Feststellung kann in Übereinstimmung mit HOHORST und PANNIER getroffen werden (35, 60).

Nach Untersuchungen von HOHORST soll die Stabilität der Pyruvatkonzentration bei einem pH-Wert von 3,5 am größten sein (35).

Auch GLOSTER/HARRIS und MARBACH/WEIL haben beobachtet, daß die Pyruvatkonzentration im sauren pH-Bereich am beständigsten ist (26, 51).

Unterschiedliche Ergebnisse finden sich in Arbeiten über das Verhalten der Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand.

CZOK und LAMPRECHT haben festgestellt, daß die Konzentrationsverluste bei $+4^{\circ}\text{C}$ im neutralen Extrakt am geringsten sind (18).

Diese Feststellung können wir aufgrund unserer Untersuchungen nicht bestätigen. Wir stimmen mit HARRIS, GLOSTER und HOHORST darin überein, daß die Pyruvatkonzentration im neutralen pH-Bereich sehr unbeständig ist (26, 35).

Um exakte Pyruvatbestimmungen im Sinne des von HOHORST definierten "Status in vivo" (35) vornehmen zu können, müssen aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit folgende Forderungen gestellt werden :

Das entnommene Blut muß sofort enteiweißt werden, da gerade in den ersten Minuten der Konzentrationsverlust, bedingt durch Erythrocytenglykolyse und Plasmaenzymaktivität, am größten ist.

Wir schlagen aus diesem Grunde vor, das Blut direkt aus der Kanüle in eiskalte Perchlorsäure fließen zu lassen.

Für die Bestimmungen darf nur ungestaut fließendes Blut verwendet werden. Dieses sollte unter Grundumsatzbedingungen entnommen werden, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

Es ist empfehlenswert, die Blutprobe sofort aufzuarbeiten und die Pyruvatkonzentration zu bestimmen, da sowohl bei Lagerung im sauren als auch im alkalischen Milieu Pyruvatverluste auftreten.

Kann der Pyruvatgehalt nicht sofort bestimmt werden, so muß der saure Überstand zwischen 0°C und $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Die Bestimmung ist aber auch dann innerhalb der ersten acht (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. vierundzwanzig Stunden (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) vorzunehmen, da es sonst auch im sauren Überstand zu

einem signifikanten Abfall der Pyruvatkonzentration kommt, der zu falschen Ergebnissen führt.

5.7. Vergleich der Ergebnisse aus beiden Bestimmungsmethoden

Bei sofortiger Enteiweißung des entnommenen Vollblutes ergibt sich aus zehn Bestimmungen mit der Mikromethode BOEHRINGER eine mittlere Pyruvatkonzentration von 0,611 mg/100 ml.

Durch Bestimmungen der Blutproben von zehn anderen Versuchspersonen mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT wurde eine etwas höhere Pyruvatkonzentration gemessen. Es ergab sich ein Mittelwert von 0,641 mg/100 ml.

Werden diese Werte mit dem t-Test nach STUDENT für nicht korrelierende Daten miteinander verglichen (Tab. 11), so ergibt sich für die Annahme eines Unterschiedes eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 69,97 \%$.

Damit kann bezüglich der gemessenen Ausgangskonzentrationen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Dagegen bestehen aber zu den Zeitpunkten 4 h ($\alpha = 4,62 \%$), 8 h ($\alpha = 3,65 \%$), 24 h ($\alpha = 0,39 \%$) und 72 h ($\alpha = 1,59 \%$) signifikante Unterschiede.

Bei Beurteilung dieser Werte der statistischen Untersuchung kann von einem eindeutigen Unterschied in den Ergebnissen der beiden angewandten Methoden nicht gesprochen werden. Von zwölf Bestimmungszeitpunkten unterscheiden sich zwar nur vier in ihren Ergebnissen signifikant, die restlichen Werte liegen aber - mit Ausnahme des Ausgangswertes - relativ nahe an dem Grenzwert von 5 %.

Wenn auch nur vier statistisch signifikante Differenzen nachgewiesen werden können, kann unseres Erachtens bei einer mittleren Irrtumswahrscheinlichkeit von nur $\alpha = 17,21 \%$

auch nicht davon gesprochen werden, daß die beiden angewandten Methoden zu den gleichen Ergebnissen führen.

Werden die Meßwerte der Pyruvatkonzentration im sauren Überstand statistisch verglichen (Tab. 11), so kann - im Gegensatz zu den Werten des Vollblutes - zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied errechnet werden. Zu den einzelnen Bestimmungszeitpunkten schwanken die Werte der Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen $\alpha = 9,93 \%$ und $\alpha = 69,97 \%$.

Errechnet man aus den Einzelwerten die mittlere Irrtumswahrscheinlichkeit, so ergibt sich $\alpha = 46,97 \%$.

Damit ist in dieser Untersuchungsreihe die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen angenommenen Unterschied in den Ergebnissen der beiden Methoden sehr groß.

Ferner ist festzustellen, daß mit der Mikromethode BOEHRINGER schon vierundzwanzig Stunden nach Blutentnahme ein signifikanter Abfall der Pyruvatkonzentration gemessen werden kann, während diese Zeitspanne bei der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT achtundvierzig Stunden beträgt.

Daher ist anzunehmen, daß die Enteiweißung des Vollblutes nach der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT eine bessere Inaktivierung der LDH bewirkt. Infolgedessen dauert es länger, bis die LDH wieder aktiv wird, und die Reduktion des Pyruvates erfolgt.

Diese Feststellung kann auch beim Abfall der Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand gemacht werden. Infolge der guten Inaktivierung der LDH, kann im neutralisierten Überstand der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT nur zwischen den übernächsten Bestimmungszeitpunkten ein

signifikanter Abfall festgestellt werden, während dieser mit der Mikromethode BOEHRINGER bereits zwischen den einzelnen Zeitpunkten gemessen wird.

Ein statistischer Vergleich der mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse ergibt zu den Zeitpunkten 24 h ($\alpha = 2,21 \%$), 48 h ($\alpha = 2,04 \%$) und 72 h ($\alpha = 1,25 \%$) signifikante Unterschiede. Es läßt sich eine mittlere Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 23,52 \%$ errechnen (Tab. 11). Dieser Wert entspricht in etwa der Irrtumswahrscheinlichkeit, wie sie für das Vollblut errechnet wurde.

5.8. Simultan-Doppelbestimmungen

Zum weiteren Vergleich der angewandten Bestimmungsmethoden wurden Simultan-Doppelbestimmungen durchgeführt (Tab. 13).

In der ersten Serie, in der die Bestimmungen einer jeden Methode von einem anderen Untersucher durchgeführt wurden, bestehen zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Pyruvatkonzentrationen im stehenden Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand signifikante Unterschiede ($\alpha < 0,1 \%$).

Da aber die Meßwerte aus den Doppelbestimmungen nach der Mikromethode BOEHRINGER stark schwanken, kann der persönliche Fehler in dieser Serie eine entscheidende Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Simultan-Doppelbestimmungen, durchgeführt von einem Untersucher, geben daher bessere Vergleichsmöglichkeiten (Tab. 14).

Aus je siebzehn Doppelbestimmungen der Pyruvatkonzentration im Vollblut ergibt sich mit der Mikromethode BOEHRINGER ein Mittelwert von $0,291 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ und mit der

mod. Methode CZOK-LAMPRECHT ein Mittelwert von 0,303 mg/100 ml.

Werden diese Werte mit Hilfe des t-Testes für korrelierende Daten statistisch ausgewertet, so ergibt sich für einen angenommenen Unterschied zwischen den Ergebnissen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 37,8 \%$.

Damit kann in dieser Serie zwischen den beiden angewandten Methoden kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es kann aber auch gesagt werden, daß die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit für einen angenommenen Unterschied mit 37,8 % nicht sehr groß ist.

5.9. Recovery-Tests

Ebenso wie die Einzelversuche dienten die Recovery-Tests dazu, die Mikromethode BOEHRINGER und die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT auf ihre Richtigkeit zu untersuchen.

Eine 2,0 mM-Pyruvatstandardlösung in Vollblut, in den sauren Überstand oder in die Küvette pipettiert, wird mit der Mikromethode BOEHRINGER zu 89,508 %, 82,372 % und 76,578 % wiedergefunden (Tab. 15a).

Diese Werte stimmen in etwa mit denen von GLOSTER und HARRIS überein, die bei Recovery-Versuchen Wiederfindungsraten zwischen 55 % und 97 % messen konnten (26).

Möglicherweise kommen für die relativ niedrigen Wiederfindungsraten der Mikromethode BOEHRINGER mehrere Ursachen infrage.

Zunächst kann infolge einer Restaktivität der LDH ein Teil des Pyruvates reduziert worden sein (26). Ferner ist anzunehmen, daß die während der Aufarbeitung geforderte circa fünfzehnminutige Aufbewahrung der Proben

im neutralisierten Überstand einen Pyruvatverlust bedingt.

Außerdem stellte TFELT-HANSEN fest, daß der von der Firma BOEHRINGER für ihre Bestimmungsmethodik empfohlene Phosphatpuffer die Instabilität des NADH erhöht (74).

Günstigere Werte wurden bei Messungen mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT festgestellt. Die zugegebenen Pyruvatmengen konnten zwischen 96,902 % und 104,402 % nachgewiesen werden (Tab. 15b).

Diese Werte entsprechen den Ergebnissen, wie sie auch von LANDON, MARBACH, REDETZKI und SEGAL gefunden wurden (47, 51, 62, 68).

Damit kann gesagt werden, daß mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT die zugegebene Pyruvatmenge zu annähernd 100 % nachgewiesen werden kann.

Werden die Ergebnisse mit Hilfe des t-Testes für abhängige Stichproben untersucht, so kann zwischen den Werten der beiden angewandten Methoden kein signifikanter Unterschied errechnet werden.

Mit $\alpha = 22,9 \%$, $\alpha = 7,8 \%$ und $\alpha = 6,7 \%$ ist aber eine sehr geringe Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelt worden.

Damit kann gesagt werden, daß eine starke Tendenz zu einem signifikanten Unterschied besteht, der bei einer größeren Versuchsanzahl wahrscheinlich nachgewiesen werden könnte.

5.10. Folgerungen aus dem Vergleich der beiden angewandten optisch-enzymatischen Pyruvat-Bestimmungsmethoden

Aufgrund der vorliegenden Meßwerte kann die Frage, ob die angewandten Bestimmungsmethoden zu den gleichen Ergebnissen führen, nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Es ist anzunehmen, daß die Enteiweißung des Blutes bei der Pyruvatbestimmung der wichtigste Faktor ist. Wird, wie bei der Mikromethode BOEHRINGER, ein Volumenanteil Blut mit einem Volumenanteil Perchlorsäure enteiweißt, so ist die Inaktivierung der LDH anscheinend nur unvollständig.

Dafür sprechen die relativ niedrigen Wiederfindungswerte bei dieser Methode. Ferner kann festgestellt werden, daß bei den direkten Vergleichen, die mit der Mikromethode BOEHRINGER gemessenen Werte niedriger sind als diejenigen, die mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT gefunden wurden. Auch bei Messungen der Pyruvatkonzentrationen im sauren und neutralisierten Überstand kann gegenüber den Werten der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT ein schneller Konzentrationsabfall festgestellt werden.

Die Enteiweißung von einem Volumenanteil Blut mit drei Volumenanteilen Perchlorsäure, wie sie die mod. Methode CZOK-LAMPRECHT fordert, bewirkt anscheinend eine bessere Inaktivierung der LDH.

Sowohl im sauren als auch im neutralisierten Überstand wurde bei dieser Methode eine langsamere Konzentrationsabnahme festgestellt. Außerdem kann eine abgemessene Pyruvatmenge, die nach Enteiweißung des Blutes zu einzelnen Reaktionsgemischen pipettiert wurde, zu nahezu 100 % nachgewiesen werden.

Lediglich in der Serie der Kontrollversuche wurden mit der Mikromethode BOEHRINGER größere Pyruvatkonzentrationen gemessen als mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT.

Da in dieser Serie die Pyruvatkonzentration in einer Standardlösung und nicht im Vollblut gemessen wurde, entfällt die Enteiweißung der Proben.

Auch diese Beobachtung spricht unseres Erachtens dafür, daß durch die Enteiweißung nach der Mikromethode BOEHRINGER die Erythrocyten- und Plasmaenzymaktivitäten nicht vollständig gehemmt werden.

Werden die einzelnen Ergebnisse statistisch ausgewertet, so kann in der Überwiegenden Anzahl der Werte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Es darf aber nicht übersehen werden, daß die errechneten Werte der Irrtumswahrscheinlichkeit für einen angenommenen Unterschied oft nicht sehr groß sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Da wir in unserem Arbeitskreis bei Pyruvatbestimmungen im Rahmen der isolierten Rattenleberperfusion sehr unterschiedliche Meßwerte fanden und auch in der Literatur unterschiedliche Bestimmungsverfahren angegeben werden, sollten in der vorliegenden Arbeit optimale Bedingungen ausgearbeitet werden, um eine im steady state des Intermediärstoffwechsels vorhandene aktuelle Blutpyruvatkonzentration im Sinne des von HOHORST definierten "Status in vivo" vornehmen zu können.

Zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration wurden zwei optisch-enzymatische Verfahren ausgewählt, die Mikromethode BOEHRINGER und die modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT.

Ferner sollten diese beiden Bestimmungsmethoden auf ihre Präzision und Richtigkeit untersucht und bezüglich ihrer Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Mit Hilfe einer 2,0 mM-Pyruvatstandardlösung erfolgte zunächst die Überprüfung der Mikromethode BOEHRINGER und der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT auf Richtigkeit und Präzision.

Für die Mikromethode BOEHRINGER konnte als Maß für die Präzision ein Variationskoeffizient von $VK = \pm 1,62 \%$ und eine Richtigkeit von $d = 1,59 \%$ ermittelt werden.

Die entsprechenden Werte der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT betrugen $VK = \pm 0,96 \%$ und $d = 0,23 \%$.

Es konnte festgestellt werden, daß die mit beiden Bestimmungsmethoden ermittelten Meßwerte innerhalb der von Qualitätskontrollen geforderten Grenzen lagen.

Bei Untersuchungen der Pyruvatkonzentration im bei 4°C aufbewahrten heparinisierten Vollblut konnte infolge Erythrocytenglykolyse und Plasmaenzymaktivität ein schneller Abfall

des Pyruvates festgestellt werden, der sofort nach Blutentnahme einsetzt. Anschließend erfolgt zwischen den Zeitpunkten 8 h und 24 h (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) bzw. 48 h (Mikromethode BOEHRINGER) ein signifikanter Wiederanstieg der Pyruvatkonzentration.

Im sauren Überstand konnte dagegen frühestens nach vierundzwanzig Stunden (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. achtundvierzig Stunden (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT) ein signifikanter Konzentrationsabfall gemessen werden.

Im neutralisierten Überstand fällt die Pyruvatkonzentration während der gesamten Versuchsdauer von zweiundsiebzig Stunden kontinuierlich ab. Mit der Mikromethode BOEHRINGER wurden zwischen den einzelnen Bestimmungszeitpunkten signifikante Konzentrationsverluste gemessen, während diese mit der mod. Methode CZOK-LAMPRECHT nur zwischen den übernächsten Zeitpunkten beobachtet werden konnten.

Als Ursache der Konzentrationsabnahme des Pyruvates in wässrigen Lösungen werden entweder eine Restaktivität der LDH oder auch eine Polymerisation für möglich erachtet.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse müssen für eine Bestimmung der Pyruvatkonzentration im Sinne des von HOHORST definierten "Status in vivo" folgende Forderungen gestellt werden :

1. Blutentnahme unter Grundumsatzbedingungen und ohne Stauung des Blutgefäßes
2. Sofortige Enteiweißung des Blutes
3. Möglichst sofortige Aufarbeitung der enteiweißten Blutprobe.

Sollte dies nicht möglich sein, dann Lagerung des sauren Überstandes zwischen 0° und $+4^{\circ}\text{C}$ bis acht

Stunden (Mikromethode BOEHRINGER) bzw. vierundzwanzig Stunden (mod. Methode CZOK-LAMPRECHT).

Bis zu diesen Zeitpunkten konnte mit unserer Versuchsanordnung kein signifikanter Abfall der Pyruvatkonzentration gemessen werden.

Werden die durch Simultan-Doppelbestimmungen und Recovery-Tests ermittelten Meßwerte der beiden angewandten Nachweismethoden statistisch miteinander verglichen, so kann nur in wenigen Fällen ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die für einen angenommenen Unterschied errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit ist aber relativ klein, so daß sich die Frage, ob die beiden angewandten Bestimmungsverfahren zu den gleichen Ergebnissen führen, aufgrund dieser Untersuchungen nicht mit Sicherheit beantworten läßt.

7. ABBILDUNGEN

Abb. 1 : siehe Text Seite 1

Abb. 2 : siehe Text Seite 22

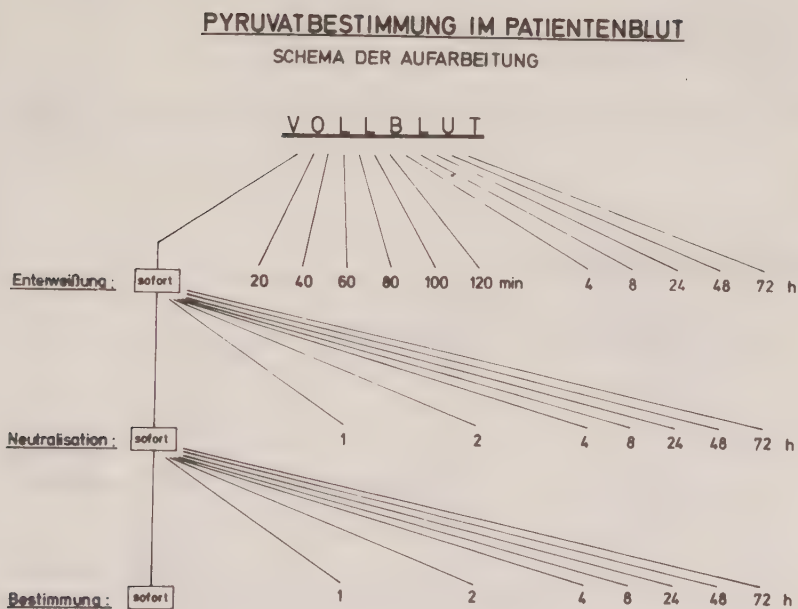


Abb. 3

Ergebnisse der Kontrollversuche:

Mikromethode BOEHRINGER

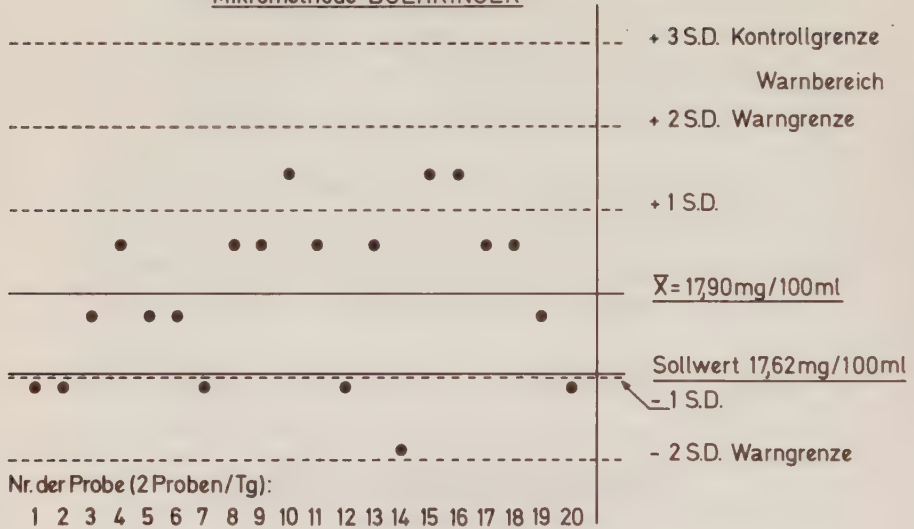


Abb. 4

Ergebnisse der Kontrollversuche:

Modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT

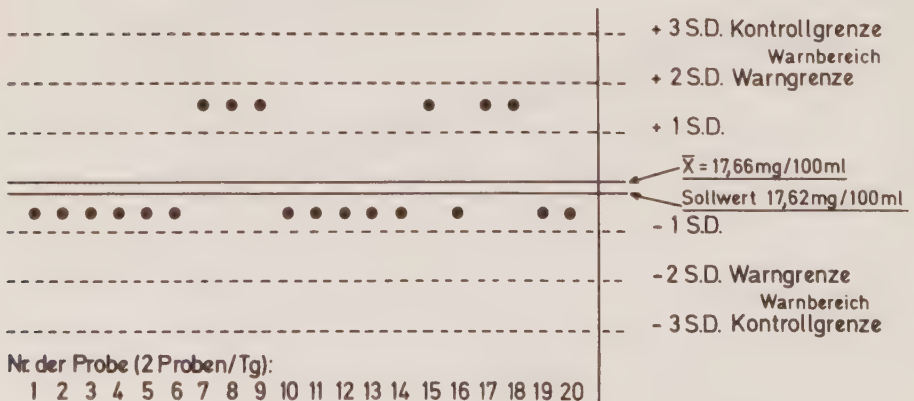


Abb. 5

PYRUVAT / VOLLBLUT (n=10)

IB: Sofortige Enteiweißung,
Aufbewahrung des Überstandes bei 4°C
(Mikromethode BOEHRINGER)

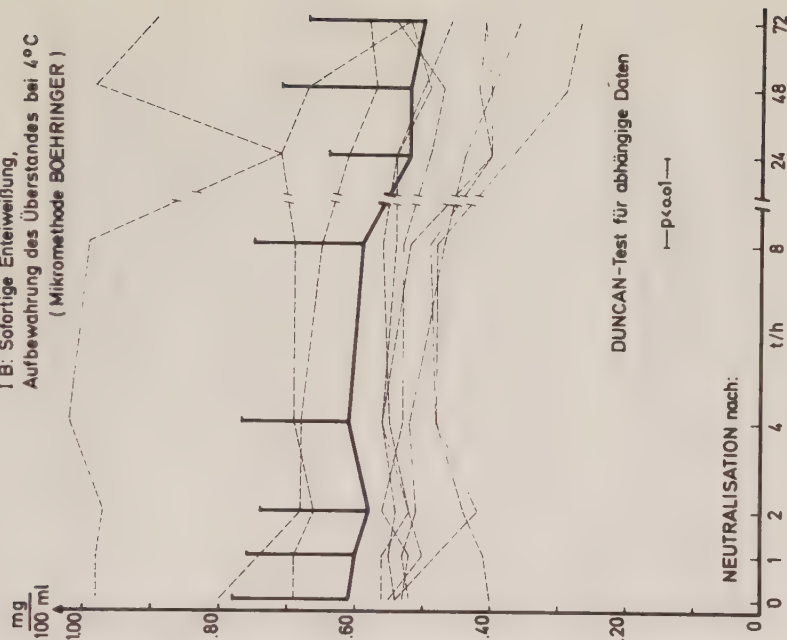


Abb. 7

PYRUVAT / VOLLBLUT (n=10)

IA: Aufbewahrung des Vollblutes bei 4°C
(Mikromethode BOEHRINGER)

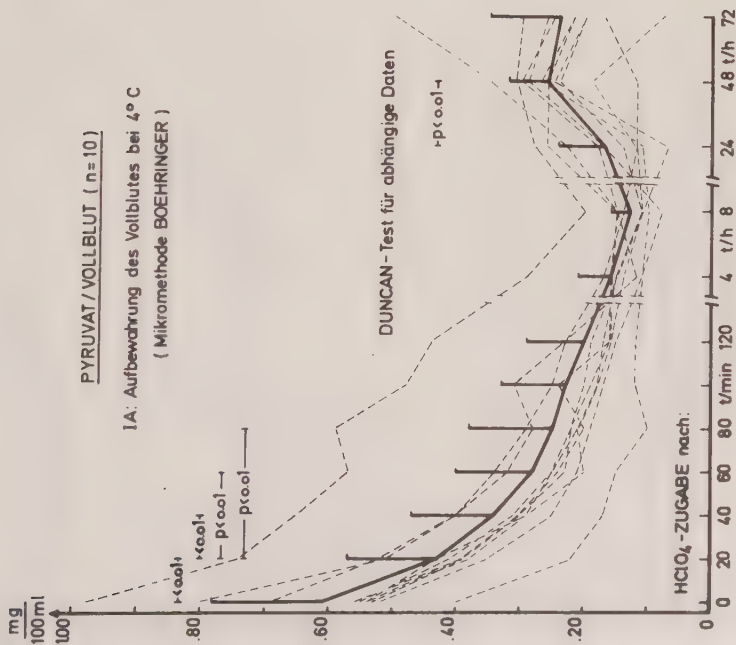


Abb. 6

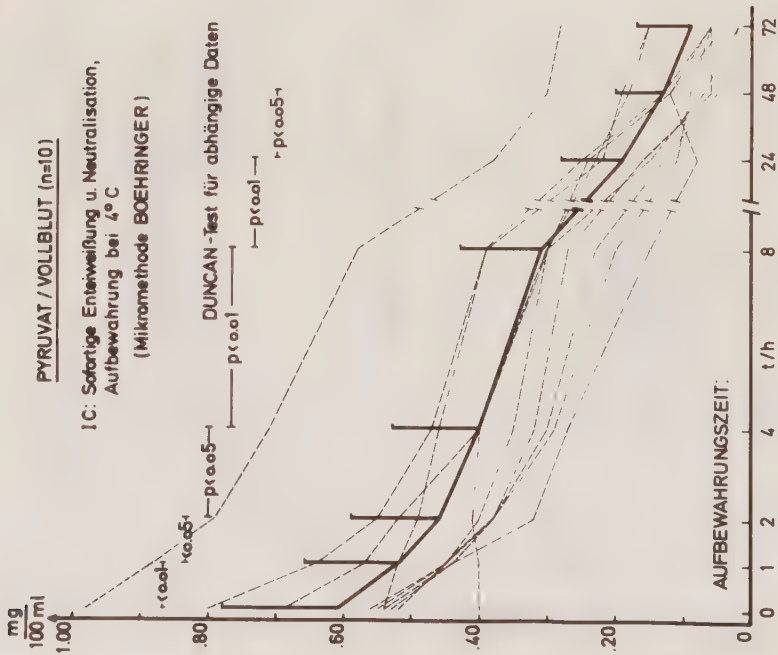


Abb. 8

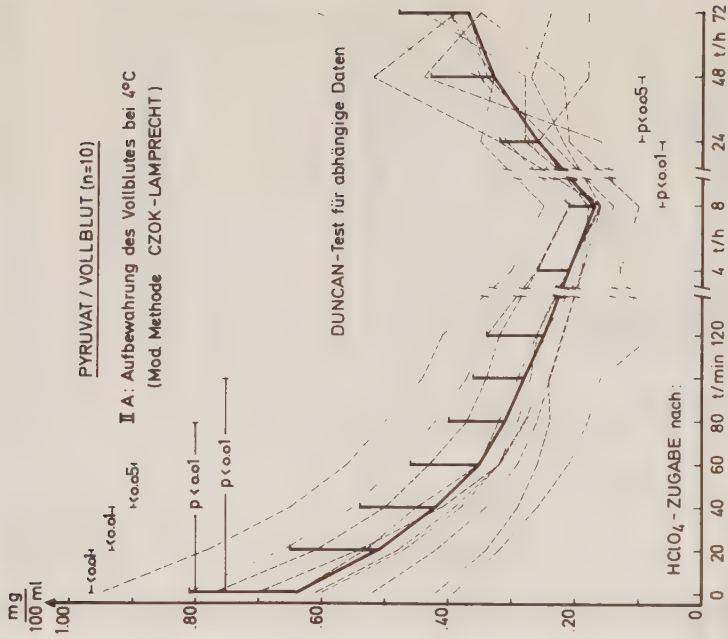


Abb. 9

PYRUVAT / VOLLBLUT (n=10)

II B: Sofortige Enteiweißung,
Aufbewahrung des Überstandes bei 4°C
(Mod. Methode CZOK-LAMPRECHT)

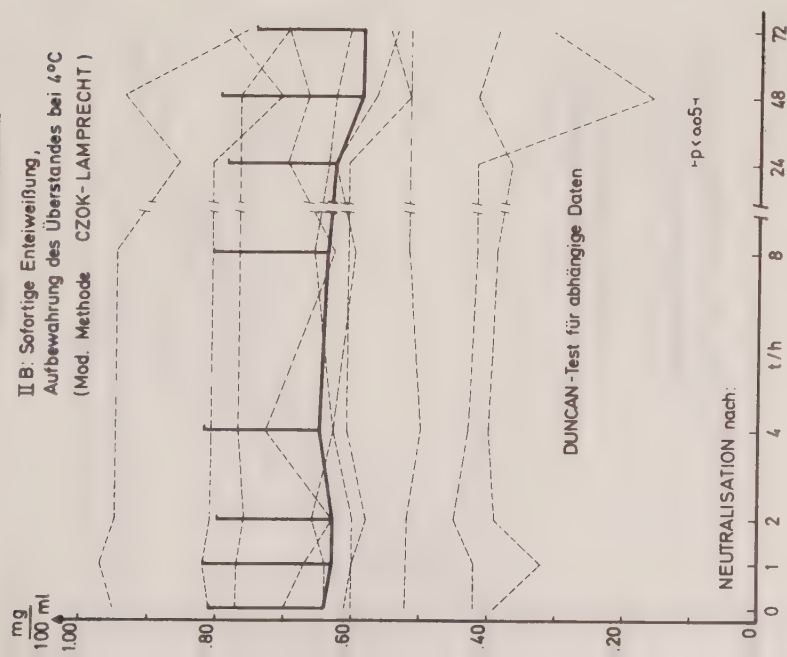


Abb. 10

PYRUVAT / VOLLBLUT (n=10)

II C: Sofortige Enteiweißung u. Neutralisation,
Aufbewahrung bei 4°C
(Mod. Methode CZOK-LAMPRECHT)

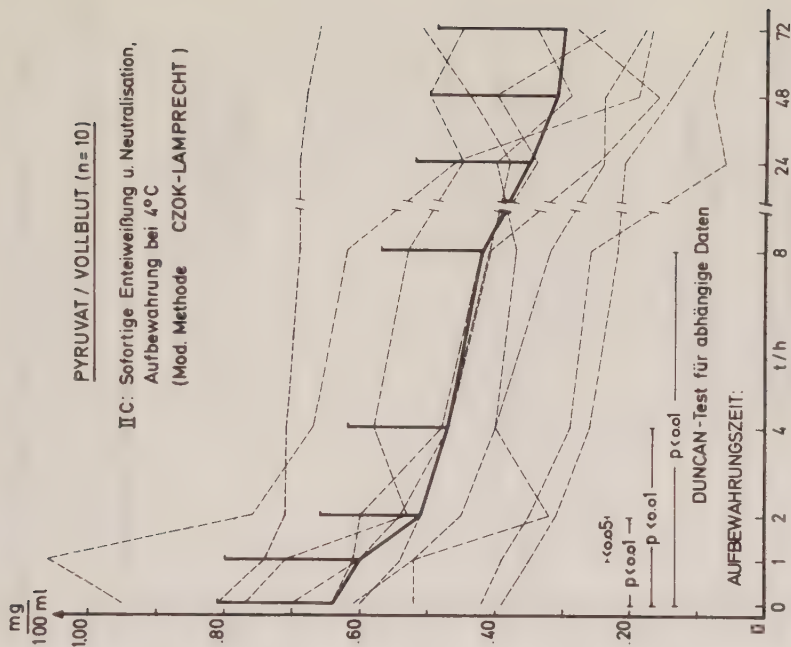


Abb. 11

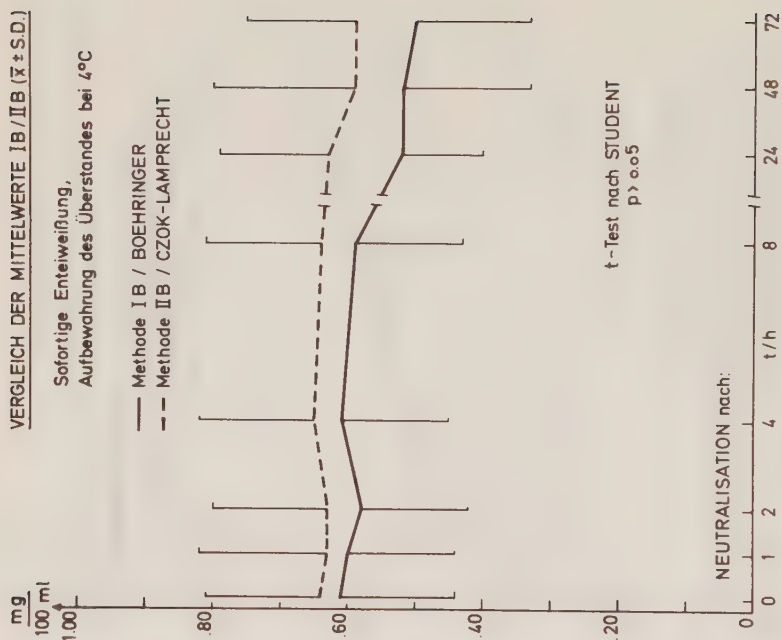


Abb. 13

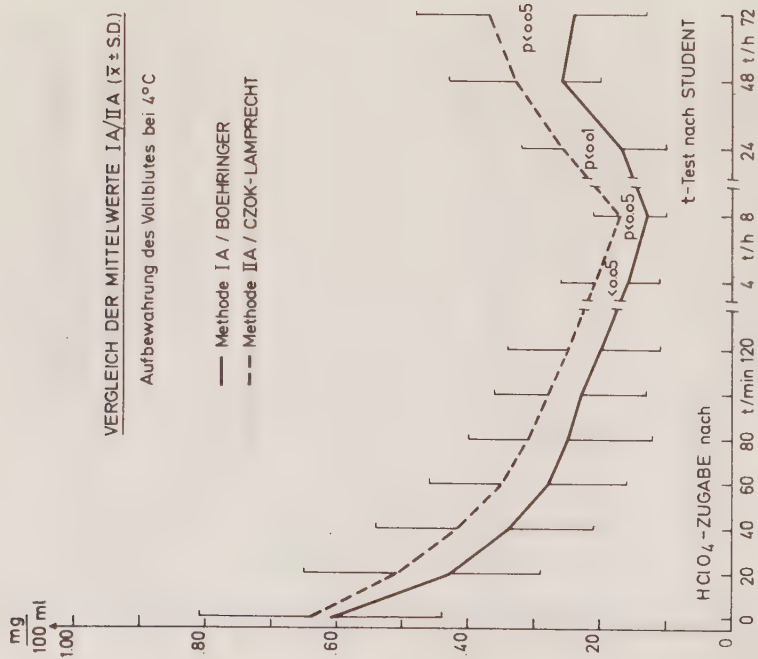


Abb. 12

Prozentualer Abfall der Pyruvatkonzentration im Vollblut
Aufbewahrung des Vollblutes bei 4°C

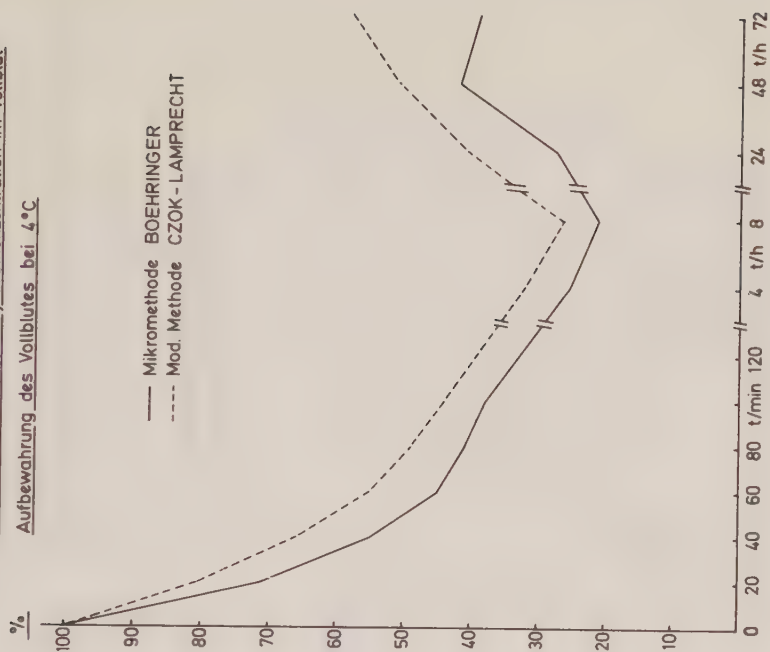


Abb. 15

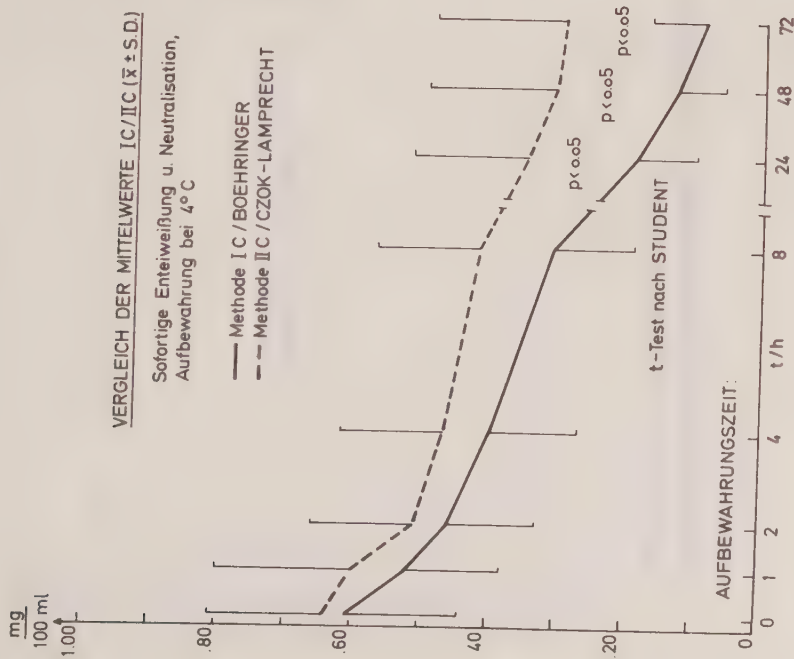


Abb. 14

Prozentualer Abfall der Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand

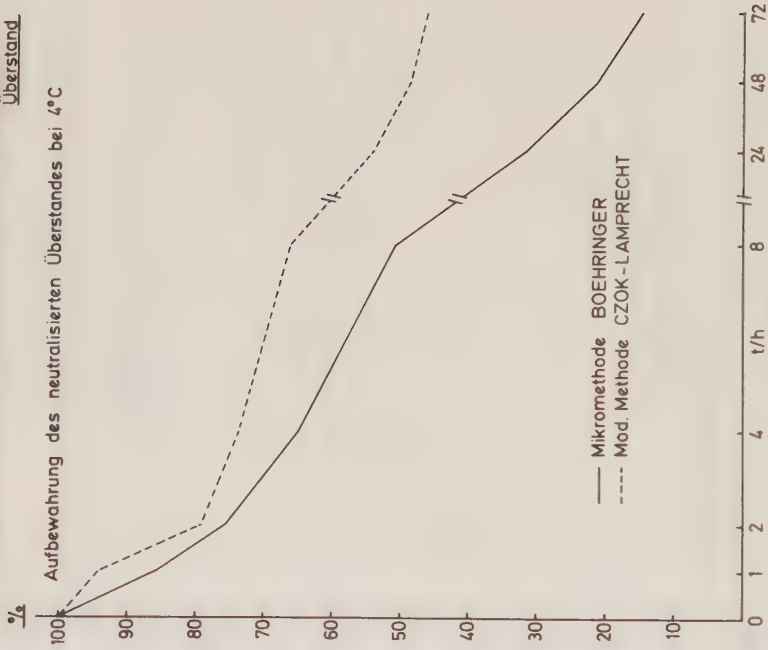


Abb. 17

Prozentualer Abfall der Pyruvatkonzentration im sauren Überstand
Aufbewahrung des Überstandes bei 4°C

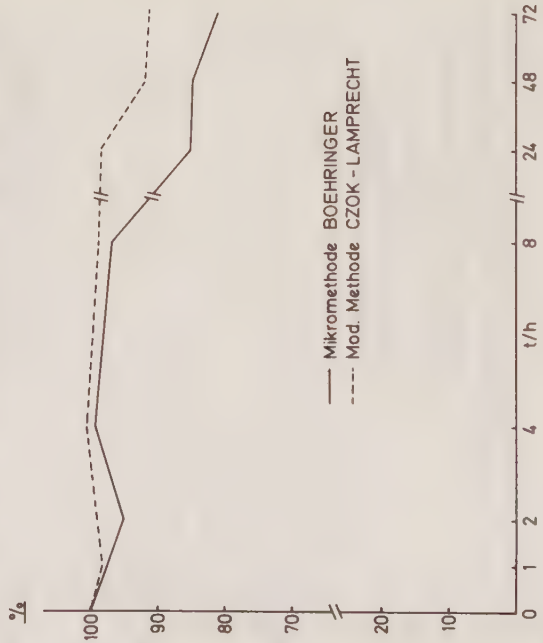


Abb. 16

8. TABELLEN

METHODIK DER PYRUVATBESTIMMUNG

	Enteiweißung	Neutralisation	Bestimmung
MIKRO - METHODE *	1.000ml Vollblut	./ 1000ml Überstand	./ 0.500ml Zentrifugat
BOEHRINGER	+ 1.000ml HClO_4 , 1.2N → pH: 0.5-0.7	+ 0.500 ml Puffer (0.7M Trikaliumphosphat) → pH: 7-8	+ 0.050ml 2,5mM NADH + 0.005ml 2mg LDH/ml
Modifikation **	1.000ml Vollblut	a) ./ 2.000ml Überstand + 0.400-0.440ml 2N KOH → pH: 2.5-3.0	./ 1.00ml Probenpuffergemisch
CZOK-LAMPRECHT	+ 3.000ml HClO_4 , 0.6N → pH: 0.5-0.8	b) ./ 0.400ml Probe + 0.600ml 0.5M Triäthanol- amin-Puffer → pH: 7.6	+ 0.020ml ca. 6mM β -NADH + 0.010ml 0.5mg LDH/ml

* Viertelung der Volumina aus Makromethode

** Halbierung der Originalmengen

Tab. 1

Tab. 2 : siehe Text Seite 52

Tab. 3 : siehe Text Seite 54

Tab. 4 : siehe Text Seite 55

Tab. 5a

Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im Vollblut

Versuch Nr.	0'	20'	40'	60'	80'	100'	120'	4h	8h	24h	48h	72h
1	0,53	0,39	0,30	0,23	0,22	0,20	0,19	0,15	0,11	0,12	0,12	0,17
2	0,98	0,74	0,65	0,57	0,59	0,48	0,44	0,29	0,20	0,28	0,31	0,30
3	0,54	0,43	0,29	0,25	0,22	0,19	0,16	0,16	0,15	0,23	0,35	0,50
4	0,54	0,39	0,30	0,24	0,20	0,24	0,16	0,16	0,15	0,18	0,30	0,25
5	0,40	0,22	0,17	0,15	0,10	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,27	0,22
6	0,55	0,41	0,31	0,25	0,21	0,18	0,16	0,14	0,11	0,14	0,24	0,20
7	0,80	0,51	0,40	0,34	0,29	0,25	0,23	0,12	0,15	0,26	0,26	0,22
8	0,56	0,38	0,29	0,20	0,21	0,18	0,17	0,15	0,11	0,07	0,25	0,20
9	0,52	0,35	0,25	0,21	0,19	0,17	0,15	0,11	0,08	0,17	0,29	0,26
10	0,69	0,52	0,40	0,32	0,28	0,31	0,23	0,17	0,14	0,12	0,19	0,08
$\bar{x}$	0,611	0,434	0,336	0,276	0,251	0,232	0,201	0,156	0,130	0,168	0,258	0,240
S.D.	0,17	0,14	0,13	0,12	0,13	0,10	0,09	0,05	0,03	0,07	0,06	0,11

Tab. 5b

Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration im Vollblut
Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s. Tab. 5a) nach dem DUNCAN-Test

	0'	20'	40'	60'	80'	100'	120'	4h	8h	24h	48h	72h
0'		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20'			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40'				0	5	1	1	1	1	1	5	1
60'					0	0	5	1	1	1	0	0
80'						0	0	1	1	5	0	0
100'							0	5	1	5	0	0
120'								0	5	0	0	0
4h									0	0	1	5
8h										0	1	1
24h											1	5
48h												0

0 : nicht signifikant, 1 bzw. 5 : signifikant auf dem 1%- bzw. 5%-Niveau

Tab. 6a Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im sauren Überstand

Versuch Nr.	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
1	0,53	0,52	0,56	0,53	0,53	0,49	0,47	0,54
2	0,98	0,98	0,97	1,02	0,99	0,71	0,98	0,89
3	0,54	0,48	0,42	0,48	0,48	0,37	0,29	0,27
4	0,54	0,55	0,54	0,56	0,54	0,54	0,49	0,52
5	0,40	0,41	0,44	0,48	0,49	0,40	0,40	0,41
6	0,55	0,50	0,52	0,55	0,56	0,54	0,50	0,46
7	0,80	0,74	0,68	0,68	0,65	0,61	0,57	0,58
8	0,56	0,56	0,52	0,56	0,52	0,40	0,42	0,41
9	0,52	0,53	0,51	0,52	0,47	0,44	0,40	0,36
10	0,69	0,69	0,66	0,69	0,69	0,71	0,67	0,52
$\bar{x}$	0,611	0,596	0,582	0,607	0,592	0,521	0,519	0,496
S.D.	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,12	0,19	0,17

Tab. 6b

Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration im sauren Überstand
Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s. Tab. 6a) nach dem DUNCAN-Test

	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
0	0	0	0	0	0	1	1	1
1h			0	0	0	1	1	1
2h				0	0	1	1	1
4h					0	1	1	1
8h						1	1	1
24h							0	0
48h								0

0 : nicht signifikant; 1 : signifikant auf dem 1%-Niveau

Tab. 7a

Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im neutralisierten Überstand

Versuch Nr.	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
1	0,53	0,44	0,38	0,32	0,27	0,16	0,06	0,06
2	0,98	0,88	0,79	0,71	0,58	0,38	0,30	0,28
3	0,54	0,44	0,32	0,27	0,15	0,08	0,12	0,04
4	0,54	0,52	0,49	0,46	0,39	0,22	0,19	0,15
5	0,40	0,40	0,41	0,40	0,30	0,23	0,18	0,15
6	0,55	0,45	0,38	0,29	0,20	0,11	0,09	0,06
7	0,80	0,64	0,55	0,47	0,39	0,25	0,13	0,06
8	0,56	0,45	0,38	0,30	0,23	0,13	0,05	0,02
9	0,52	0,45	0,40	0,35	0,30	0,24	0,12	0,06
10	0,69	0,57	0,52	0,40	0,30	0,15	0,07	0,02
$\bar{x}$	0,611	0,524	0,462	0,397	0,311	0,195	0,131	0,090
S.D.	0,17	0,14	0,13	0,13	0,12	0,09	0,07	0,08

Tab. 7b

Mikromethode BOEHRINGER : Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand
Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s. Tab. 7a) nach dem DUNCAN-Test

	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
0		1	1	1	1	1	1	1
1h			5	1	1	1	1	1
2h				5	1	1	1	1
4h					1	1	1	1
8h						1	1	1
24h							5	1
48h								0

0 : nicht signifikant; 1 bzw. 5 : signifikant auf dem
1% bzw. 5%-Niveau

Tab. 8a

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT : Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im Vollblut

Versuch Nr.	0'	20'	40'	60'	80'	100'	120'	4h	8h	24h	48h	72h
11	0,70	0,54	0,41	0,32	0,28	0,22	0,16	0,13	0,13	0,16	0,44	0,35
12	0,60	0,47	0,38	0,32	0,28	0,25	0,25	0,19	0,16	0,28	0,28	0,44
13	0,52	0,42	0,34	0,29	0,26	0,24	0,22	0,19	0,14	0,24	0,34	0,37
14	0,77	0,61	0,50	0,43	0,37	0,34	0,32	0,26	0,21	0,31	0,35	0,61
15	0,61	0,48	0,39	0,32	0,29	0,27	0,26	0,21	0,16	0,32	0,52	0,39
16	0,64	0,53	0,45	0,35	0,32	0,29	0,26	0,21	0,16	0,22	0,27	0,24
17	0,95	0,78	0,65	0,56	0,50	0,44	0,41	0,30	0,25	0,35	0,33	0,40
18	0,81	0,66	0,55	0,48	0,42	0,37	0,34	0,26	0,21	0,27	0,35	0,40
19	0,42	0,34	0,29	0,26	0,24	0,24	0,22	0,19	0,18	0,26	0,18	0,18
20	0,39	0,32	0,26	0,21	0,18	0,16	0,08	0,13	0,10	0,21	0,22	0,35
$\bar{x}$	0,641	0,515	0,422	0,354	0,314	0,282	0,252	0,207	0,170	0,262	0,328	0,373
S.D.	0,17	0,14	0,12	0,11	0,09	0,08	0,09	0,05	0,04	0,06	0,10	0,11

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT : Pyruvatkonzentration im Vollblut
 Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s. Tab. 8a) nach dem DUNCAN-Test

	0'	20'	40'	60'	80'	100'	120'	4h	8h	24h	48h	72h
0'		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20'			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40'				5	1	1	1	1	1	1	1	0
60'					0	5	1	1	1	1	0	0
80'						0	0	1	1	0	0	0
100'							0	5	1	0	0	1
120'								0	1	0	5	1
4h									0	0	1	1
8h										1	1	1
24h											5	1
48h												0

0 : nicht signifikant, 1 bzw. 5 : signifikant auf dem 1% bzw. 5%-Niveau

Tab. 9a

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT :
Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im sauren Überstand

Versuch Nr.	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
11	0,70	0,67	0,63	0,73	0,63	0,70	0,67	0,70
12	0,60	0,60	0,60	0,63	0,60	0,63	0,57	0,54
13	0,52	0,52	0,52	0,50	0,52	0,52	0,52	0,52
14	0,77	0,77	0,76	0,77	0,77	0,77	0,77	0,70
15	0,61	0,60	0,58	0,61	0,61	0,61	0,52	0,55
16	0,64	0,64	0,66	0,63	0,66	0,64	0,63	0,61
17	0,95	0,97	0,95	0,95	0,95	0,86	0,94	0,76
18	0,81	0,82	0,81	0,81	0,81	0,81	0,71	0,79
19	0,42	0,42	0,45	0,43	0,42	0,42	0,16	0,31
20	0,39	0,32	0,39	0,40	0,39	0,37	0,42	0,39
$\bar{x}$	0,641	0,633	0,635	0,646	0,636	0,633	0,591	0,587
S.D.	0,17	0,19	0,17	0,17	0,17	0,16	0,21	0,16

Tab. 9b

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT : Pyruvatkonzentration im sauren Überstand
 Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s. Tab. 9a) nach dem DUNCAN-Test

	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
0		0	0	0	0	0	5	5
1h			0	0	0	0	5	5
2h				0	0	0	5	5
4h					0	0	5	1
8h						0	5	5
24h							5	5
48h								0

0 : nicht signifikant; 1 bzw. 5 : signifikant auf dem
 1%- bzw. 5%-Niveau

Tab. 10a

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT :
Pyruvatkonzentration (mg/100 ml) im neutralisierten Überstand

Versuch Nr.	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
11	0,70	0,60	0,54	0,47	0,41	0,38	0,44	0,51
12	0,60	0,54	0,51	0,47	0,41	0,25	0,16	0,28
13	0,52	0,52	0,32	0,40	0,32	0,24	0,24	0,18
14	0,77	0,71	0,53	0,58	0,53	0,45	0,50	0,45
15	0,61	0,52	0,45	0,40	0,37	0,40	0,29	0,34
16	0,64	0,61	0,60	0,48	0,42	0,34	0,40	0,24
17	0,95	1,06	0,76	0,67	0,62	0,46	0,19	0,17
18	0,81	0,74	0,71	0,71	0,69	0,69	0,68	0,66
19	0,42	0,39	0,35	0,29	0,26	0,06	0,08	0,06
20	0,39	0,35	0,31	0,26	0,22	0,21	0,14	0,08
$\bar{x}$	0,641	0,604	0,508	0,473	0,425	0,348	0,312	0,297
S.D.	0,17	0,20	0,15	0,15	0,15	0,17	0,19	0,19

Tab. 10b

modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT :
 Pyruvatkonzentration im neutralisierten Überstand
 Statistischer Vergleich der Mittelwertsunterschiede (s.Tab. 10a) nach dem DUNCAN-Test

	0	1h	2h	4h	8h	24h	48h	72h
0	0	1	1	1	1	1	1	1
1h			5	1	1	1	1	1
2h				0	5	1	1	1
4h					0	1	1	1
8h						0	1	1
24h							0	0
48h								0

0 : nicht signifikant; 1 bzw. 5 : signifikant auf dem
 1% bzw. 5%-Niveau

Tab. 11

Vergleich der Ergebnisse Mikromethode BOEHRINGER / modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT
mit dem t-Test für unabhängige Daten

Irrtumswahrscheinlichkeit α (%) zum jeweiligen Zeitpunkt :

	0'	20'	40'	60'	80'	100'	120'	4h	8h	24h	48h	72h
Vollblut	69,97	20,98	13,90	13,57	22,86	23,96	23,00	4,62	3,65	0,39	7,98	1,59
saurer Überstand	69,97			64,89			47,99	61,01	55,92	9,93	43,55	22,49
neutr. Überstand	69,97			32,16			49,00	23,77	7,79	2,21	2,04	1,25

Signifikanz bei $\alpha \leq 5\%$

Pyruvatkonzentration im Vollblut, im sauren und neutralisierten Überstand zum jeweiligen Zeitpunkt (Konzentrationsangabe in %)

Zeitpunkt	Mikromethode BOEHRINGER		Mod. Methode CZOK-LAMPRECHT	
	Vollblut	saurer Überstand	Vollblut	saurer Überstand
0'	100,00	100,00	100,00	100,00
20'	71,03		80,34	
40'	54,99		65,83	
60'	45,17	97,55	55,23	98,75
80'	41,08		48,99	
100'	37,97		43,99	
120'	32,90	95,25	39,31	99,06
4h	25,53	99,35	32,29	100,78
8h	21,28	96,89	26,52	99,22
24h	27,50	85,27	40,87	98,75
48h	42,23	84,94	51,17	92,20
72h	39,28	81,18	58,19	91,58

Tab. 13 Simultan-Doppelbestimmungen mit der Mikromethode BOEHRINGER und der modifizierten Methode CZOK-LAMPRECHT, von zwei Untersuchern durchgeführt

		P y r u v a t k o n z e n t r a t i o n					
		im Vollblut		im sauren Überstand		im neutral. Überstand	
Zeit-		A	B	A	B	A	B
punkte							
Versuch Nr. 21	0'	0,670	0,765	0,670	0,765	0,670	0,765
	40'/60'	0,400	0,470	0,660	0,725	0,620	0,740
	80'	0,280	0,385				
	120'	0,205	0,270	0,655	0,750	0,500	0,640
	4h	0,100	0,185	0,600	0,760	0,405	0,605
	8h	0,040	0,160	0,560	0,740	0,280	0,475
	24h	0,230	0,395	0,560	0,715	0,075	0,290
Versuch Nr. 22	0'	0,565	0,655	0,565	0,655	0,565	0,655
	40'/60'	0,270	0,315	0,490	0,605	0,450	0,580
	80'	0,215	0,185				
	120'	0,085	0,130	0,460	0,580	0,195	0,510
	4h	0,060	0,090	0,505	0,600	0,330	0,465
	8h	0,015	0,080	0,530	0,600	0,250	0,360
	24h	0,170	0,160	0,400	0,505	0,075	0,290

angegeben sind die Mittelwerte (mg/100 ml) aus den Doppelbestimmungen

A : Mikromethode BOEHRINGER, Untersucher L

B : Mod. Methode CZOK-LAMPRECHT, Untersucher A

Tab. 14 Simultan-Doppelbestimmungen
Mikromethode BOEHRINGER - mod. Methode CZOK-LAMPRECHT
zum direkten Vergleich der Ergebnisse aus beiden
Methoden,
Versuche von einem Untersucher durchgeführt

Versuch Nr.	Mikromethode BOEHRINGER	mod. Methode CZOK-LAMPRECHT
	Mittelwert (mg/100 ml)	Mittelwert (mg/100 ml)
23	0,325	0,320
24	0,095	0,110
25	0,670	0,670
26	0,435	0,475
27	0,105	0,120
28	0,210	0,200
29	0,245	0,260
30	0,070	0,080
31	0,480	0,600
32	0,140	0,215
33	0,555	0,475
34	0,110	0,120
35	0,280	0,385
36	0,115	0,140
37	0,280	0,280
38	0,085	0,070
39	0,745	0,635
$\bar{x}$	0,291	0,303
n = 17		

Tab. 15a

Recovery-Test : Mikromethode BOEHRINGER

Zu einer jeden Aufarbeitungsstufe der Pyruvatbestimmung wurden 0,030 ml bzw. 0,010 ml einer 2,0 mM - entsprechend 17,62 mg/100 ml - Pyruvatstandardlösung pipettiert, die mit der Bestimmungsmethode nachgewiesen werden sollten.

Angegeben sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen (mg/100 ml bzw. %) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit α (%) für einen angenommenen Unterschied der Ergebnisse Mikromethode BOEHRINGER / mod. Methode CZOK-LAMPRECHT

Nr.	Versuch Pyruvat mg/100 ml	wiederge- fundene Standardlsg. im Vollblut		wiederge- fundene Standardlsg. im Überstand		wiederge- fundene Standardlsg. in Küvette	
		mg/100 ml	%	mg/100 ml	%	mg/100 ml	%
40	0,325	17,53	99,49	15,83	89,84	13,39	75,96
41	0,095	17,18	97,51	15,41	87,46	17,84	101,22
42	0,670	15,93	90,41	14,36	81,47	8,03	45,57
43	0,435	11,83	67,11	9,45	53,60	13,35	75,74
44	0,105	16,39	93,02	17,53	99,49	14,87	84,40
$\bar{x}$	0,326	15,772	89,508	14,516	82,372	13,496	76,578
S.D.	0,241	2,292	13,024	3,054	17,344	3,559	20,193
α			22,9		7,8		6,7

Tab. 15b

Recovery-Test : Modifizierte Methode CZOK-LAMPRECHT

Zu einer jeden Aufarbeitungsstufe der Pyruvatbestimmung wurden 0,030 ml bzw. 0,010 ml einer 2,0 mM - entsprechend 17,62 mg/100 ml - Pyruvatstandardlösung pipettiert, die mit der Bestimmungsmethode nachgewiesen werden sollten. Angegeben sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen (mg/100 ml bzw. %) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit α (%) für einen angenommenen Unterschied der Ergebnisse Mikromethode BOEHRINGER / mod. Methode CZOK-LAMPRECHT

wiedergefundene Pyruvat-Standardlösung :									
Versuch Nr.	Blut- Pyruvat mg/100 ml	im Vollblut mg/100 ml %	im Überstand mg/100 ml %	im Überstand + KOH mg/100 ml %	in Küvette mg/100 ml %				
40	0,320	17,89	101,53	17,55	99,60	17,40	98,78	16,17	91,77
41	0,110	18,16	103,07	17,26	97,99	17,40	98,78	17,91	101,65
42	0,670	19,24	109,20	16,98	96,37	17,83	101,19	12,84	72,87
43	0,475	17,89	101,53	17,69	100,40	17,97	101,98	15,13	85,87
44	0,120	14,91	84,62	18,54	105,22	21,37	121,28	23,32	132,35
$\bar{x}$	0,339	17,618	99,990	17,604	99,916	18,394	104,402	17,074	96,902
S.D.	0,239	1,613	9,155	0,590	3,345	1,683	9,543	3,944	22,387
α			22,9		7,8				6,7

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALPERT, N.R. :

Lactate production and removal and the regulation of metabolism.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 995 - 1012 (1965)

2. BARRENSCHEEN, H.K., M. DREGUSS :

Eine kolorimetrische Mikromethode zur Bestimmung des Methylglyoxals.

Biochem. Z. 233, 305 - 310 (1931)

3. BAUER, H. :

Die Brenztraubensäurekonzentration im Blut von multiplen Sklerosen und Kontrollfällen,
Vergleichende Studien zur Methodik und klinischen Bedeutung der Brenztraubensäurebestimmung im Blut.
Biochem. Z. 327, 491 - 501 (1956)

4. BERGMAYER, H.U. :

The standardization of enzymological methods.
VI. Intern. Kongreß Klin. Pathologie,
Okt. 1966, Rom; Relazioni, S. 175 - 187

5. BERGMAYER, H.U. :

Bestimmung der Konzentration von Metaboliten
(Endwert-Methoden).

In : BERGMAYER, H.U. : Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. I, S. 111 - 128, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim

6. BERGMAYER, H.U., E. BERNT, M. GRASSL, G. MICHAL :
Ermittlung von Meßergebnissen.
In : BERGMAYER H.U. : Methoden der enzymatischen
Analyse. Bd. I, S. 329 - 338, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim
7. BOEHRINGER :
persönliche Mitteilung
8. BOEHRINGER :
persönliche Mitteilung
9. BRODAN, V., E. KUHN :
Die Beziehung zwischen der Milch- und der Brenz-
traubensäure bei physischer Belastung,
Veränderungen des Redoxpotentials im Lactat-
Pyruvat-System.
Z. ges. exp. Medizin 146, 34 - 45 (1968)
10. BUEDING, E., R. GOODHART :
Removal of pyruvic acid from human blood in vitro.
J. Biol. Chem. 141, 931 - 944 (1941)
11. BUEDING, E., H. WORTIS :
The stabilization and determination of pyruvic
acid in the blood.
J. Biol. Chem. 133, 585 - 591 (1940)
12. BÜTTNER, H. :
Statistische Qualitätskontrolle in der klinischen
Chemie, Theoretische Grundlagen und praktische
Durchführung.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 41 - 48 (1967)

13. BÜTTNER, H., E. HANSERT, D. STAMM :

Auswertung, Kontrolle und Beurteilung von Meß-
ergebnissen.

In : BERGMEYER, H.U. : Methoden der enzymatischen
Analyse. Bd. I, S. 339 - 421, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim

14. CAMPBELL, R.C. :

Statistische Methoden für Biologie und Medizin.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)

15. CAVALLINI, D., N. FRONTALI, G. TOSCHI :

Keto-Acid Content of Human Blood and Urine.
Nature 164, 792 - 793 (1949)

16. CAVALLINI, D., N. FRONTALI :

Quantitative Determination of Keto-Acids by
Paper Partition Chromatography.
Biochem. et biophys. acta 13, 439 (1954)

17. CLAUSS, G., H. EBNER :

Grundlagen der Statistik.
Für Psychologen, Pädagogen und Soziologen.
Verlag Harri Deutsch, Frankfurt und Zürich (1972)

18. CZOK, R., W. LAMPRECHT :

Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-
phosphat.

In : BERGMEYER, H.U. : Methoden der enzymatischen
Analyse. Bd. II, S. 1491 - 1496, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim

19. DOCUMENTA GEIGY :

Wissenschaftliche Tabellen.

J.R. Geigy AG, Pharmazeutische Abteilung,

7. Auflage (1969)

20. DUNCAN, D.B. :

Multiple range and multiple F-Tests.

Biometrics 11, 1 - 42 (1955)

21. EULER, H.V., I. SÄBERG, B.V. EULER :

Einfluß von Hormonpräparaten auf den Brenztraubensäure-Gehalt des Blutes und die Geschwulstentwicklung bei sarkomtragenden Ratten.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 270, 125 - 140
(1941)

22. FRANKE, W., E. HOLZ :

Zur Kenntnis der Spezifität von Dehydrogenasen, IV,
Über das Verhalten halogen-, hydroxyl- und amino-
substituierter Milchsäuren gegenüber Lactat-Dehydro-
genase aus Muskel.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 314, 22 - 27 (1959)

23. FRIEDEMANN, T.E., G.E. HAUGEN :

Pyruvic Acid

II. The Determination of Keto-acids in Blood and
Urine.

J. Biol. Chem. 147, 415 - 442 (1943)

24. FRIEDEMANN, T.E., G.E. HAUGEN, T.C. KMIECIAK :

Pyruvic Acid

III. The level of pyruvic and lactic acids, and the
lactic-pyruvic ratio, in the blood of human sub-
jects. The effect of food, light muscular activity,
and anoxia at high altitude.

J. Biol. Chem. 157, 673 - 689 (1945)

25. FRIEDMANN, B., H.I. NAKADA, S. WEINHOUSE :
Metabolism of 2-carbon acids in the intact rat.
Fed. Proc. 10, 185 (1951)
26. GLOSTER, J.A., P. HARRIS :
Observations on an enzymic method for the
estimation of pyruvate in blood.
Clin. Chim. Acta 7, 206 - 211 (1962)
27. GORDON, J.J., J.H. QUASTEL :
CLXII. Estimation of lactic acid in biological
material by oxidation with ceric sulphate.
Biochem. J. 33, 1332 - 1337 (1939)
28. GRASSL, M., M. NELBOECK-HOCHSTETTER, K. BEAUCAMP :
Probleme der Analytik von Pyridin-Nucleotid-
Coenzymen
I. Mitteilung. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid.
Z. Anal. Chem. 252, 331 - 336 (1970)
29. HENLEY, K.S., H.S. WIGGINS, H.M. POLLARD, A. ARBOR :
The determination of pyruvate in plasma.
J. Lab. clin. Med. 47, 978 - 980 (1956)
30. HENRY, R.J. :
Clinical Chemistry, Principles and Technics.
Harper & Row, New York, Evanston & London and
John Weatherhill, Inc., Tokyo (1964)
31. HESS, B. :
Über eine kinetisch-enzymatische Bestimmung der
L(+)-Milchsäure im menschlichen Serum und anderen
biologischen Flüssigkeiten.
Biochem. Z. 328, 110 - 116 (1956)

32. HÖFLING, O. :

Lehrbuch der Physik
7. Auflage (1966)
Ferd. Dummlers Verlag, Bonn

33. HOHORST, H.J. :

Enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure.
Biochem. Z. 328, 509 - 521 (1957)

34. HOHORST, H.J. :

Die enzymatische Bestimmung von L(+)-Milchsäure,
L(-) α -Glycerophosphorsäure und L(-)-Äpfelsäure.
Diplomarbeit, Universität Marburg (1959)

35. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ, TH. BÜCHER :

Über Metabolitgehalte und Metabolit-Konzentrationen
in der Leber der Ratte.
Biochem. Z. 332, 18 - 46 (1959)

36. HOLZER, H., H.W. GOEDDE, S. SCHNEIDER :

Umsatz von Oxybrenztraubensäure und Glykolaldehyd
mit Carboxylase und Alkoholdehydrase aus Hefe.
Biochem. Z. 327, 245 - 254 (1955)

37. HUCKABEE, W.E. :

Control of Concentration Gradients of Pyruvate
and Lactate Across Cell Membranes in Blood.
J. Appl. Physiol. 9, 163 - 170 (1956)

38. HUCKABEE, W.E. :

Relationships of pyruvate and lactate during
anaerobic metabolism.
I. Effects of infusion of pyruvate or glucose
and of hyperventilation.
J. clin. Invest. 37, 244 - 254 (1958)

39. HUCKABEE, W.E. :

Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism.

II. Exercise and formation of O_2 -debt.

J. clin. Invest. 37, 255 - 263 (1958)

40. HUCKABEE, W.E. :

Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism.

III. Effect of breathing low-oxygen gases.

J. clin. Invest. 37, 264 - 271 (1958)

41. HUCKABEE, W.E. :

Abnormal Resting Blood Lactate

II. Lactic Acidosis.

Am. J. Med. 30, 840 - 848 (1961)

42. KARLSON, P. :

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.

8. Auflage (1972)

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

43. KIPPING, H. :

Zum Brenztraubensäure-Stoffwechsel.

I. Mitteilung. Die Bedeutung der Brenztraubensäure bei Carcinom und Hepatitis epidemica und ihre Beeinflussung durch Cocarboxylase.

Dtsch. Arch. Klin. Med. 199, 162 - 168 (1952)

44. KREYSZIG, E. :

Statistische Methoden und ihre Anwendung.

3. Auflage (1968)

Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen

45. KUBOWITZ, F., P. OTT :

Isolierung und Kristallisation eines Gärungs-
fermentes aus Tumoren.

Biochem. Z. 314, 94 - 117 (1943)

46. LAMPRECHT, W., T. DIAMANTSTEIN, F. HEINZ, P. BALDE :

Phosphorylierung von D-Glycerinsäure zu 2-Phospho-
D-glycerinsäure mit Glyceratkinase in Leber, I
Zur Biochemie des Fructosestoffwechsels, II.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 97 - 112
(1959)

47. LANDON, J., J.K. FAWCETT, V. WYNN :

Blood pyruvate concentration measured by a specific
method in control subjects.

J. clin. Path. 15, 579 - 584 (1962)

48. LAUDAHN, G. :

Fermentaktivitäten und Konzentration von Stoff-
wechselzwischenprodukten im Blut bei Leber- und
Herzkrankheiten.

Klin. Wschr. 37, 850 - 858 (1959)

49. LONG, C. :

A General Method for the Estimation of α -Keto-
acids, and its Application to α -Keto-acid
Metabolism in Pigeon Brain.

Biochem. J. 36, 807 - 814 (1942)

50. LU, G.D. :

XXX. Studies on the metabolism of pyruvic acid in
normal and vitamin B₁-deficient states

I. A rapid, specific and sensitive method for the
estimation of blood pyruvate.

Biochem. J. 33, 249 - 254 (1939)

51. MARBACH, E.P., M.H. WEIL :

Rapid Enzymatic Measurement of Blood Lactate
and Pyruvate,
Use and Significance of Metaphosphoric Acid as
a Common Precipitant.
Clin. Chem. 13, 314 - 325 (1967)

52. MATTENHEIMER, H. :

Die Theorie des enzymatischen Tests.
Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica (1973)

53. MCQUATE, J.T., M.F. UTTER :

Equilibrium and Kinetic Studies of the Pyruvic
Kinase Reaction.
J. Biol. Chem. 234, 2151 - 2157 (1959)

54. MEISTER, A. :

Enzymatic preparation of α -Keto acids.
J. Biol. Chem. 197, 309 - 317 (1952)

55. NETHELER, H.G. :

Absorptionsphotometrie, Meßprinzip und Begriffe.
In : BERGMEYER, H.U. : Methoden der enzymatischen
Analyse. Bd. I, S. 190 - 194, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim

56. NEVILLE, J.F., R.L. GELDER :

Modified Enzymatic Methods for the Determination
of L-(+)-Lactic and Pyruvic Acids in Blood.
Am. J. clin. Pathol. 55, 152 - 158 (1971)

57. NEWIRTH, T.L., M.A. DIEGELMAN, E.K. PYE, R.G. KALLEN :
Multiple Immobilized Enzyme Reactors :
Determination of Pyruvate and Phosphoenolpyruvate
Concentrations Using Immobilized Lactate Dehydro-
genase and Pyruvate Kinase.
Biotechnol. Bioeng. 15, 1089 - 1100 (1973)
58. NISHIMURA, T., T. IMAI, A. KANEKO, T. SUZUKI :
Determination of Pyruvate by Thiosemicarbazone
Method and Iodometry.
Kitasato Arch. of Exp. Med. 45, 205 - 212 (1972)
59. OLSON, R.E. :
"Excess Lactate" and Anaerobiosis.
Ann. Intern. Med. 59, 960 - 963 (1963)
60. PANNIER, R., F. KLIMT :
Eine Mikromethode zur Bestimmung von Laktat,
Pyruvat und Glukose aus 0,1 ml Blut.
Z. med. Labortechnik 14, 285 - 294 (1973)
61. PLATT, B.S., G.D. LU :
CLXXXVII. Studies on the metabolism of pyruvic
acid in normal and vitamin B₁-deficient states
IV. The accumulation of pyruvic acid and other
carbonyl compounds in beri-beri and the effect
of vitamin B₁.
Biochem. J. 33, 1525 - 1537 (1939)
62. REDETZKI, H., H. BLOEDORN, H.W. BANSI :
Einfluß der Thioctinsäure auf den Brenztrauben-
säure- und α -Ketoglutarsäure-Blutspiegel bei
Leberkranken.
(Enzymatische Analyse von Brenztraubensäure und
 α -Ketoglutarsäure in einem Bestimmungssatz).
Klin. Wschr. 34, 845 - 846 (1956)

63. RODWELL, V.W., J.C. TOWNE, S. GRISOLIA :
The kinetic properties of yeast and muscle
phosphoglyceric acid mutase.
J. Biol. Chem. 228, 875 - 890 (1957)
64. SCHETTLER, G. :
Innere Medizin
Bd. I, 3. Auflage (1972)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
65. SCHIMASSEK, H. :
Perfusion of isolated rat liver with a semisyn-
thetic medium and control of liver function.
Life Sci. 11, 629 - 634 (1962)
66. SCHIMASSEK, H. :
Regulation of lactate and pyruvate levels in
perfusion medium by the isolated rat liver.
Life Sci. 11, 635 - 638 (1962)
67. SCHIMASSEK, H. :
Der Einfluß der Leber auf den extracellulären
Redox-Quotienten Lactat/Pyruvat.
Versuche an der isoliert perfundierten Ratten-
leber.
Biochem. Z. 336, 468 - 473 (1963)
68. SEGAL, S., A.E. BLAIR, J.B. WYNGAARDEN :
An enzymatic spectrophotometric method for the
determination of pyruvic acid in blood.
J. Lab. clin. Med. 48, 137 - 143 (1956)

69. SIMON, E., C. NEUBERG :

Quantitative Bestimmung von Methylglyoxal, Brenztraubensäure nebst Acetaldehyd für sich und im Gemisch sowie gleichzeitige Bestimmung von Milchsäure in Gegenwart der genannten Stoffe und in einer Materialprobe.

Biochem. Z. 232, 479 - 484 (1931)

70. STRAUB, F.B. :

Quantitative Methoden zur Untersuchung der Fumarsäurekatalyse.

Bestimmung der BRS. mit Salicylaldehyd.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 244, 117 - 127 (1936)

71. STRUCK, E. :

unveröffentlicht

72. TALKE, H., F.W. SCHMAHL, J. KELLER :

Zur Wirkung des Nicotinsäureamids auf die Spiegel von unveresterten Fettsäuren, Acetoacetat, Lactat, Pyruvat und Glucose im Blut bzw. Plasma der Ratte.
Z. ges. exp. Med. 151, 232 - 240 (1969)

73. TEST-FIBEL :

Pyruvat, Enzymatische Bestimmung der Konzentration von Pyruvat im Blut.

C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

Biochemica, 1. Auflage 1973

74. TFELT-HANSEN, P., O. SIGGAARD-ANDERSEN :

Lactate and Pyruvate Determination in 50 μ l Whole Blood.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 27, 15 - 19 (1971)

75. TSIRIMBAS, A., W. STICH :

Über die Brenztraubensäure im Blut und Serum bei malignen Tumoren des Menschen.

Klin. Wschr. 38, 1196 - 1198 (1960)

76. ULMER, W.T., B. RASCHE :

Milchsäure- und Brenztraubensäurekonzentration im Armvenenblut bei gesunden Versuchspersonen, unter Ruhebedingungen bei venöser Stauung und unter Arbeitsbelastung.

Z. ges. exp. Med. 145, 185 - 201 (1968)

77. VAUPEL, P., H. GÜNTHER :

Ein Verfahren zur simultanen Bestimmung von Glucose-, Lactat- und Pyruvatkonzentrationen in Mikroblutproben.

Pflügers Arch. 323, 351 - 360 (1971)

78. WALLER, H.D. :

Biochemical Determinants of Red Cell Life Span.
Ser. Haemat. 2, 34 - 52 (1965)

79. WEIL, M.H., A.A. AFIFI :

Experimentelle und klinische Untersuchungen über Laktat und Pyruvat als Indikatoren für den Schweregrad des akuten Kreislaufversagens (Schock).

In : ZIMMERMANN, W.E., I. STAIB :

Schock, Stoffwechselveränderungen und Therapie,
S. 147 - 157

Internationales Symposium, Freiburg i.Br.,

30. Oktober - 1. November 1969,

F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York (1970)

80. WENDEL, W.B. :

The determination of pyruvic acid and the
preparation of Lithium pyruvate.
J. Biol. Chem. 94, 717 - 725 (1932)

81. WICHERT, P.V. :

Kritische Bemerkungen zum Begriff des Exceßlactat.
Dtsch. med. Wschr. 37, 1775 - 1777 (1968)

82. WICHERT, P.V., O. BERGENGRUEN :

Laktat-Bestimmung im Blut.
Med. Welt 22, 752 - 756 (1971)

83. WIELAND, O., B.V. JAGOW-WESTERMANN :

Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase aus Hefe.
In : BERGMEYER, H.U. : Methoden der enzymatischen
Analyse. Bd. II, S. 1530 - 1537, 3. Auflage (1974),
Verlag Chemie, Weinheim

84. WINER, B.J. :

Statistical Principles in Experimental Design.
International Student Edition (1970)

85. WOLD, F., C.E. BALLOU :

Studies on the enzyme enolase
I. Equilibrium studies.
J. Biol. Chem. 227, 301 - 312 (1957)

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik, Herrn Professor Dr. med. H. Hamelmann, mit dessen Zustimmung diese Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Herrn Professor Dr. Bernhardt danke ich für die Übernahme des Correferates.

Herrn Dr. Nitschke danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anleitungen und seine Unterstützung, die vorliegenden Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Für wertvolle Anregungen sowie sein kritisches Engagement bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Laas.

Ebenfalls möchte ich Frau Linsel, Medizinisch-Technische-Assistentin, für ihre Unterstützung sowie Bereitwilligkeit danken, mir bei den biochemischen Analysen durch ihr hervorragendes Wissen manche Hilfe gegeben zu haben.

LEBENS LAUF

Als erstes Kind der Eheleute Karl Achenbach und Irma, geb. Hinn, wurde ich am 20.1.1948 in Breidenstein, Kreis Marburg-Biedenkopf, geboren.

Meine ersten Lebensjahre verbrachte ich an meinem Geburtsort.

1952 zogen meine Eltern nach Breidenbach, Kreis Marburg-Biedenkopf.

Dort besuchte ich von 1954 bis 1961 die Volksschule.

1961 bestand ich die Aufnahmeprüfung an dem Aufbaugymnasium in Laasphe, Kreis Siegen. Am 4.11.1966 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1967 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn mit dem Studium der Zahnheilkunde.

Im Herbst 1968 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Herbst 1970 die zahnärztliche Vorprüfung.

Mein Staatsexamen in der Zahnheilkunde legte ich am 11.1.1974 in Marburg ab.

Nach Abschluß der experimentellen Untersuchungen meiner Dissertation war ich von Juli 1975 bis Januar 1976 als

Assistent in einer zahnärztlichen Praxis tätig.

Seit dem 2.2.1976 leiste ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr als Stabsarzt.

Seit dem 22.2.1974 bin ich mit dem Industriekaufmann Helga Achenbach, geb. Bittner, verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten :

Amon, Aurich, Bernhardt, Castenholz, Dimroth, Enghardt,
Goebell, Haan, Hamelmann, Havemann, Hennis, Hering,
Heuser, Hort, Janke, Karlson, Keil, Koecke, Korb, Kühnel,
Mahr, Mann, Niemeyer, Nöth, Oehmig, Pantke, Petry, Pfütz,
Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schienbein, Schiff,
Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel, Siegert,
Stuke, Vakilzadeh, Vogt, Walcher, Zilliken.

